

**Untersuchung der Kälteschockantwort von  
*Bacillus subtilis***

-

**$\sigma^L$ -abhängige Transkriptionsaktivatoren  
und  
Identifizierung des kältespezifischen  
Wachstumsdefizits des Stammes JH642**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
von

**Frank Wiegeshoff**

aus Lübeck (Schleswig-Holstein)

Marburg/Lahn 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom April 2003 bis November 2006 am Fachbereich Chemie / Biochemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. M. A. Marahiel durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
\_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. M. A. Marahiel

Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Dezember 2006

Gewidmet meinen Eltern, die mir  
den Weg hierher ermöglicht haben.



*„Nur der, der kann, darf auch.“*

Erich Kaufmann



## Zusammenfassung

Die Untersuchung der Kälteschockanpassung von Mikroorganismen wird in Modellorganismen wie dem Gram-positiven mesophilen Bodenbakterium *B. subtilis* durchgeführt. Dabei ist das komplett entschlüsselte Genom von großem Vorteil. Für die Untersuchungen wird ein Temperaturschock von 37 °C auf 15 °C als Kälteschock definiert. *B. subtilis* reagiert auf einen Kälteschock mit einer veränderten Genexpression, die zu einer Anpassung seiner gesamten Zellphysiologie führt. Diese Anpassung ermöglicht das Überleben bei niedrigen Temperaturen, indem die kälteempfindlichen Systeme durch die Induktion kälteprotektiver Proteine geschützt werden. Zu den betroffenen Systemen zählen die gehinderte Initiation der Translation, die durch kältestabilisierte Sekundärstrukturen der mRNA zu Stande kommt, und die abnehmende Fluidität der Zellmembran und der damit gekoppelten Prozesse wie z. B. dem Stofftransport.

In dieser Arbeit wurden durch genomweite Transkriptions- und Proteomanalysen neue kälteinduzierte Gene und Proteine identifiziert. Sie wurden auf ihre Relevanz für die Kälteanpassung des *B. subtilis* hin untersucht. Aus früheren und auch aus diesen Studien ging die Kälteinduktion des Gens *yplP* hervor. Es wurde gezeigt, dass die Deletion dieses Gens einen kältesensitiven Phänotyp bewirkt und so für die Adaptation nach einem Kälteschock relevant sein könnte. YplP zeigt signifikante Homologien zu den vier bekannten  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren AcoR, BkdR, LevR und RocR. In dieser Arbeit konnte aus Untersuchungen zu allen fünf Aktivatoren und dem  $\sigma^L$ -Faktor durch Deletionsstudien gekoppelt mit Wachstumsanalysen die Kälterelevanz der zwei Transkriptionsaktivatoren YplP und BkdR, sowie des  $\sigma^L$ -Faktors für die Kälteanpassung des *B. subtilis* eindeutig bestätigt bzw. nachgewiesen werden. In biochemischen Untersuchungen mittels EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) konnte die Zusammenarbeit von SigL mit BkdR gezeigt werden. Sie interagierten jeweils alleine und zusammen mit der zu aktivierenden Target-DNA. Die aus Sequenzanalysen und DNA-Arrays erhaltenen Promotorregionen der putativen Target-Gene von YplP konnten jedoch nicht in einem EMSA mit SigL und YplP interagieren. Somit sind die von  $\sigma^L$  und YplP zusammen regulierten Gene weiterhin unbekannt.

Des Weiteren konnte die Ursache des kältespezifischen Defekts des Stammes JH642 in der Biosynthese der verzweigtkettigen Fettsäuren identifiziert und charakterisiert werden. Er zeigte sich durch ein verlangsamtes Wachstum des Stammes JH642 im Vergleich zum MR168 nach einem Kälteschock. In dieser Arbeit wurde der Defekt über Sequenzanalysen im Gen *ilvB* lokalisiert. Mittels Komplementationsstudien und biochemischer Charakterisierung durch einen photometrischen Assay wurde IlvB als Quelle für diesen Defekt bestätigt. IlvB ist

an der Umwandlung von Threonin zu Isoleucin beteiligt. Isoleucin dient als Vorläufer für die Synthese von verzweigtkettigen Fettsäuren, die für die Kälteanpassung der Membran essentiell sind.



Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

**Wiegeshoff, F., C. L. Beckering, M. Debarbouille, and M. A. Marahiel.** (2006). Sigma L is important for cold shock adaptation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:3130-3.

**Wiegeshoff, F., and M. A. Marahiel.** (2006). *Bacillus subtilis* strain JH642 shows a cold-sensitive phenotype due to a mutation in the Acetolactate Synthase. *J Bacteriol* **submitted**.

Weitere Publikationen:

**Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegeshoff, P. L. Graumann, and M. A. Marahiel.** (2006). Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:240-8.

**May, J. J., R. Finking, F. Wiegeshoff, T. T. Weber, N. Bandur, U. Koert, and M. A. Marahiel.** (2005). Inhibition of the D-alanine: D-alanyl carrier protein ligase from *Bacillus subtilis* increases the bacterium's susceptibility to antibiotics that target the cell wall. *Febs J* **272**:2993-3003.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Bacillus subtilis</i> .....	1
1.2 Definition der Kälteschockantwort .....	2
1.3 Betroffene Systeme nach einem Kälteschock .....	3
1.3.1 Initiation der Translation .....	4
1.3.2 Membrananpassung .....	5
1.3.3 $\sigma^L$ -abhängige Transkriptionsaktivatoren .....	7
1.4 Aufgabenstellung .....	8
<b>2. Materialien .....</b>	<b>11</b>
2.1 Geräte .....	11
2.2 Enzyme, Chemikalien und Kits .....	12
2.3 Vektoren .....	14
2.3.1 pX .....	14
2.3.2 pDG783 .....	14
2.3.3 pNKH1 (pBAD-TOPO-Derivat) .....	15
2.4 Mikroorganismen .....	16
2.5 Medien .....	17
2.6 Antibiotika-Zusätze .....	19
<b>3. Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Allgemeiner Teil .....	20
3.1.1 Anzucht von <i>Bacillus subtilis</i> in SMM-Minimalmedium (SMM) .....	20
3.1.2 Aufnahme von Wachstumskurven .....	20
3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen .....	21
3.2 Arbeiten mit DNA .....	21
3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	22
3.2.3 Reinigung der PCR-Fragmente .....	24
3.2.4 Herstellung von Gendeletionsmutanten mittels PCR .....	24
3.2.5 Agarosegelelektrophorese .....	25
3.2.6 Einfache Reinigung von Plasmid-DNA .....	26
3.2.7 Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen .....	27

3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten .....	28
3.2.9 Vorbereitung von $\text{CaCl}_2$ kompetenten <i>E. coli</i> Zellen.....	28
3.2.10 Transformation von $\text{CaCl}_2$ kompetenten <i>E. coli</i> Zellen .....	28
3.2.11 Vorbereitung von <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrottransformation .....	29
3.2.12 Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation .....	29
3.2.13 Herstellung und Transformation kompetenter <i>B. subtilis</i> Zellen .....	30
3.3 Arbeiten mit RNA .....	31
3.3.1 RNA-Präparation.....	31
3.3.1.1 Zellkultivierung und Probenentnahme .....	31
3.3.1.2 Zellaufschluss für RNA-Präparation.....	32
3.3.1.3 RNA-Extraktion mit der „Saure Phenol“-Methode .....	33
3.3.1.4 Reinigung gesamter RNA .....	34
3.3.1.5 Reinheitskontrolle gesamter RNA .....	34
3.3.2 Northernblotanalyse .....	34
3.3.2.1 Erstellen einer digoxigeninmarkierten RNA-Sonde .....	35
3.3.2.2 Gießen von Agarosegelen zur RNA-Trennung.....	35
3.3.2.3 Probenvorbereitung von RNA für Agarosegele.....	35
3.3.2.4 Aufbereitung von RNA-Agarosegelen.....	36
3.3.2.5 Dot-Blot.....	36
3.3.2.6 RNA-Hybridisierung und Waschen .....	36
3.3.2.7 Detektion .....	38
3.3.3 Transkriptionsanalyse von <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
3.3.3.1 Isolation der gesamten RNA aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	38
3.3.3.2 Reverse Transkription und Markierung .....	38
3.3.3.3 Reinigung der cDNA.....	39
3.3.3.4 Prähybridisierung der Mikroarrays .....	40
3.3.3.5 Hybridisierung der cDNA .....	40
3.3.3.6 Waschen der Mikroarrays .....	40
3.3.3.7 Detektion der Mikroarraysignale .....	40
3.3.3.8 Auswertung der Mikroarraydaten .....	41
3.4 Proteinchemischer Teil.....	41
3.4.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine.....	41
3.4.1.1 Genexpression im pNKH1-Vektor.....	41
3.4.1.2 Zellaufschluss mit dem Fluidizer .....	42

3.4.1.3 Affinitätschromatographie von His <sub>6</sub> -tag Proteinen .....	42
3.4.1.4 SDS-PAGE.....	43
3.4.1.5 Probenvorbereitung für SDS-PAGE .....	44
3.4.1.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen .....	45
3.4.2 Proteom-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese .....	45
3.4.2.1 Zellaufzucht und Probenentnahme.....	46
3.4.2.2 Aufschluss der Zellen.....	47
3.4.2.3 Gefriertrocknung der Gesamtproteinextrakte.....	48
3.4.2.4 Probenvorbereitung .....	48
3.4.2.5 Bestimmung der aufzutragenden Menge auf den IPG-Strip .....	48
3.4.2.6 Resolubilisierung der lyophilisierten Proteinextrakte.....	49
3.4.2.7 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung, IEF mit der Multiphor II.....	49
3.4.2.8 Rehydratisierung und Fokussierung.....	50
3.4.2.9 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE.....	52
3.4.2.10 Gele gießen („Gelcasting“) .....	52
3.4.2.11 Äquilibration und Auflegen der IPG-Streifen.....	54
3.4.2.12 2D-PAGE-Lauf .....	54
3.4.2.13 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250 .....	55
3.4.2.14 Autoradiographie der <sup>35</sup> S-markierten Gele .....	56
3.4.2.15 Tryptischer Verdau zur Proteinidentifizierung .....	58
3.4.3 Protein-Assays.....	59
3.4.3.1 <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA) .....	59
3.4.3.2 Aktivitätsassay für die Acetolactat Synthase aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	60
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
4.1 Identifizierung kälteinduzierter Proteine und Gene in <i>Bacillus subtilis</i> .....	62
4.1.1 Proteomanalyse von kältegeschocktem <i>Bacillus subtilis</i> JH642 durch Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese.....	63
4.1.1.1 2D-Gele im pH-Bereiche 4-5 und 5-6.....	64
4.1.2 Genomweite Transkriptionsanalyse von kältegeschocktem <i>Bacillus subtilis</i> JH642 durch DNA-Arrays .....	66
4.1.3 Konstruktion der Deletionsmutanten aus <i>Bacillus subtilis</i> JH642 .....	70
4.1.3.1 Konstruktion der <i>yj1C</i> Deletionsmutante FW11 .....	71
4.1.3.2 Konstruktion der <i>yvyD</i> Deletionsmutante JW1 .....	71
4.1.3.3 Konstruktion der <i>ybaE</i> Deletionsmutante FW23 .....	72

4.1.3.4 Konstruktion der <i>ydhM</i> Deletionsmutante FW24 .....	72
4.1.3.5 Konstruktion der <i>ysbA</i> Deletionsmutante FW25 .....	73
4.1.3.6 Konstruktion der <i>ywaC</i> Deletionsmutante FW26 .....	73
4.1.3.7 Konstruktion der <i>yshA</i> Deletionsmutante FW27 .....	74
4.1.3.8 Konstruktion der <i>yscB</i> Deletionsmutante FW28 .....	74
4.1.4 Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten aus <i>Bacillus subtilis</i> JH642 .....	75
4.1.4.1 Wachstumseigenschaften der <i>yjlC</i> Deletionsmutante FW11 .....	75
4.1.4.2 Wachstumseigenschaften der <i>yvyD</i> Deletionsmutante JW1 .....	76
4.1.4.3 Wachstumseigenschaften der <i>ybaE</i> , <i>ydhM</i> , <i>ysbA</i> , <i>ywaC</i> , <i>yshA</i> und <i>yscB</i> Deletionsmutanten .....	77
4.2 Untersuchung der kälterelevanten $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren in <i>Bacillus subtilis</i> .....	78
4.2.1 Konstruktion der Deletionsmutanten aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	79
4.2.1.1 Konstruktion der <i>acoR</i> Deletionsmutanten FW9 und FW13 .....	79
4.2.1.2 Konstruktion der <i>levR</i> Deletionsmutante FW14 .....	79
4.2.1.3 Konstruktion der <i>rocR</i> Deletionsmutante FW15 .....	79
4.2.1.4 Konstruktion der <i>bkdR</i> Deletionsmutante FW10 .....	80
4.2.1.5 Konstruktion der <i>sigL</i> Deletionsmutanten FW6 .....	80
4.2.1.6 Konstruktion der <i>yplP</i> Deletionsmutanten FW7 .....	80
4.2.2 Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten aus <i>Bacillus subtilis</i> .....	81
4.2.2.1 Wachstumseigenschaften der <i>acoR</i> , <i>levR</i> und <i>rocR</i> Deletionsmutanten .....	81
4.2.2.2 Wachstumseigenschaften der <i>bkdR</i> , <i>sigL</i> und <i>yplP</i> Deletionsmutanten .....	82
4.2.3 Unterschiede im Wachstum der <i>bkdR</i> , <i>sigL</i> und <i>yplP</i> Deletionsmutanten .....	87
4.2.3.1 Sequenzierung der deletierten Gene <i>bkdR</i> , <i>sigL</i> und <i>yplP</i> .....	87
4.2.3.2 Ausschluss polarer Effekte in <i>yplP</i> Deletionsmutante .....	87
4.2.4 Untersuchung des $\sigma^L$ -Regulons mit den Aktivatoren BkdR und YplP .....	89
4.2.4.1 Strategie zur Identifizierung von SigL und YplP regulierten Genen .....	89
4.2.4.2 Genomweite Transkriptionsanalyse der <i>yplP</i> Deletionsmutante CB15 im Vergleich zum WT JH642 .....	90
4.2.4.3 Suche nach $\sigma^L$ -Promotoren im Chromosom von <i>Bacillus subtilis</i> .....	91
4.2.4.4 Klonierung, Expression und Reinigung von BkdR, SigL und YplP .....	92
4.2.4.5 DNA-Protein-Interaktionsstudien der von BkdR und YplP regulierten Gene .....	94
4.3 Untersuchung der <i>Bacillus subtilis</i> MR168 und JH642 Stämme .....	99
4.3.1 Sequenzierung aller Gene im Biosyntheseweg zu den verzweigten Fettsäuren ...	101

4.3.2 Komplementationstudien mit <i>ilvBH</i> .....	102
4.3.3 Klonierung, Expression und Reinigung von IlvB, IlvB* und IlvH.....	104
4.3.4 Bestimmung der katalytischen Aktivität von IlvBH .....	106
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>109</b>
5.1 Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine und Gene .....	109
5.1.1 Funktionelle Einordnung der kälteinduzierten Proteine aus der Analyse des Proteoms.....	110
5.1.2 Funktionelle Einordnung der kälteinduzierten Gene aus der Analyse des Transkriptoms.....	112
5.1.2.1 Translation.....	113
5.1.2.2 mRNA-Strukturierung.....	113
5.1.2.3 DNA-Topologie .....	114
5.1.2.4 Molekültransport .....	115
5.1.2.5 Energiestoffwechsel, Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese .....	115
5.1.2.6 Hitzeschockgene.....	116
5.1.2.7 Y-Gene .....	116
5.1.3 Funktionelle Charakterisierung kälteinduzierter Proteine und Gene .....	117
5.1.4 Ausblick .....	118
5.2 Anpassung der Zellmembran von <i>Bacillus subtilis</i> nach Kälteschock .....	118
5.2.1 $\sigma^L$ und die kälterelevanten Transkriptionsaktivatoren .....	119
5.2.2 Defekt in der Biosynthese verzweigter Fettsäuren von <i>B. subtilis</i> JH642 .....	123
<b>6. Anhang .....</b>	<b>127</b>
6.1 Primer .....	127
6.2 Deletionsmutanten von <i>Bacillus subtilis</i> .....	132
<b>7. Literatur .....</b>	<b>135</b>





## Abkürzungen

2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese
A	Adenin
Aa	Acrylamid
APS	Ammoniumpersulfat
BAa	Bisacrylamid
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
C	Cytosin
cat <sup>n</sup>	Chloramphenicol (n µg/mL Endkonzentration)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
CIPs	Kälteinduzierte Proteine ( <i>cold induced proteins</i> )
CIRCE	<i>controlling inverted repeat of chaperone expression</i>
CSPs	Kälteschockproteine ( <i>cold shock proteins</i> )
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSM	Difco Sporulationsmedium
DTT	1,4-Dithio-DL-threit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
G	Guanin
gesamtRNA	gesamte aus einem Stamm isolierte RNA
h	Stunde ( <i>hour</i> )
kan <sup>n</sup>	Kanamycin (n µg/mL Endkonzentration)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter

mA	Milliampere
min	Minuten
mL	Milliliter
MOPS	3'-(n-Morcholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Massengewicht
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<sup>35</sup> S	radioaktiv markierter Schwefel
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
T	Thymin
TB	Tris/Borat-Puffer
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenolpoly-(ethylenglykolether) <sub>10</sub>
tRNA	Transfer-RNA ( <i>transfer ribonucleic acid</i> )
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (n = 20)
U	Einheit enzymatischer Aktivität ( <i>Units</i> )
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight per volume</i> )

## 1. Einleitung

Mikroorganismen kommen in Lebensräumen vor, in denen sie stetig ändernden Umweltbedingungen ausgesetzt sind. Zu diesen Veränderungen zählen die Temperatur, das Nahrungsangebot oder die Verfügbarkeit von Wasser. An die Temperaturveränderungen haben sich die Mikroorganismen ganz unterschiedlich anpassen können, so dass sie in einer Temperaturspanne von  $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  lebensfähig sind. Hierbei lassen sich die Mikroorganismen in psychrophile, mesophile, thermophile und hyperthermophile Bakterien einteilen. Der stetige Wechsel der Temperatur durch Wetterveränderungen, Tag- und Nachtwechsel oder jahreszeitlich bedingte Unterschiede zwingt die Mikroorganismen zur ständigen Anpassung, um ihren Fortbestand zu sichern. Eines dieser Bakterien ist der Modellorganismus *Bacillus subtilis*, der in der oberen Bodenschicht rasch wechselnden Umwelteinflüssen ausgesetzt ist.

### 1.1 *Bacillus subtilis*

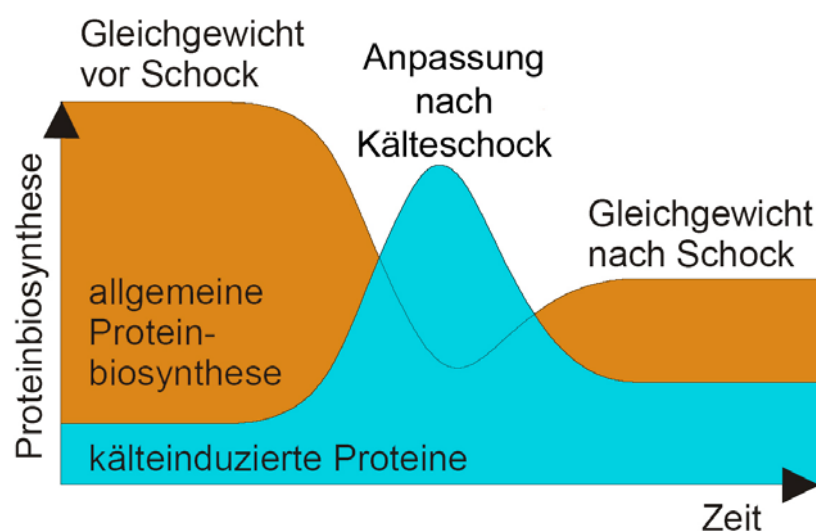
*B. subtilis* ist ein ubiquitär vorkommendes Bodenbakterium, dessen Genom vollständig entschlüsselt ist (Kunst *et al.*, 1997). Da dieser Organismus genetisch leicht zugänglich ist, ist er zu einem Modellorganismus für die Untersuchung der bakteriellen Kälteschockantwort geworden. Er repräsentiert die Gram-positive Gruppe der mesophilen Bodenbakterien und wird auch als „Heubacillus“ bezeichnet, da seine Sporen in Heuaufgüssen angereichert und daraus isoliert werden können. *B. subtilis* gehört zu der Klasse der endosporenbildenden Bakterien, besitzt einen geringen GC-Gehalt und ist fakultativ anaerob. Er besitzt die Fähigkeit in einem Temperaturbereich von  $11\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis  $53\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu wachsen, was dazu beiträgt, dass er gut für diese Studien geeignet ist.

Seine Befähigung zur Sporulation wird als Modell für ein einfaches Zelldifferenzierungssystem intensiv erforscht (Losick *et al.*, 1986, Marahiel und Zuber, 1999). Eine Kaskade von Sigmafaktoren bewirkt die Umstellung von vegetativem Wachstum auf Sporulation. Währenddessen wird auch der Proteinhaushalt gravierend umgestellt (Losick *et al.*, 1986, Marahiel und Zuber, 1999). Zur Kommunikation mit seinen Artgenossen kann das Bakterium nach Erreichen der Stationärphase Signalmoleküle aussenden, um das Zellwachstum bei schwindendem Nahrungsangebot zu drosseln (Kaiser und Losick, 1993). Bei der Bekämpfung unerwünschter Nahrungskonkurrenz sind einige Stämme von *B. subtilis*

in der Lage hochwirksame Peptidantibiotika in die Umgebung zu sekretieren (Zuber *et al.*, 1993).

## 1.2 Definition der Kälteschockantwort

Als Kälteschockantwort wird bei Mikroorganismen die physiologische Anpassungsreaktion an sinkende Umgebungstemperaturen bezeichnet. Bei sinkender Umgebungstemperatur, kommt es zu einer Störung des Fließgleichgewichts in der Zelle. Darauf reagiert die Zelle mit einer Anpassungsreaktion, bis sich ein neues Fließgleichgewicht bei der niedrigeren Temperatur eingestellt hat. Es lässt sich ein Gesamtbild der Anpassung darstellen (**Abb. 1.2-1**): Hierbei lässt sich dieses Bild in das optimierte Wachstum bei hoher Temperatur, die Anpassungsphase nach dem Kälteschock und das optimierte Wachstum bei der niedrigeren Temperatur unterteilen. Die Anpassungsphase steht bei der Untersuchung der Kälteschockantwort im Vordergrund. Nach einem Kälteschock wird bei Mikroorganismen zunächst ein Rückgang der allgemeinen Proteinbiosynthese beobachtet (Jones *et al.*, 1987). Erst nach der Anpassung an die tiefere Temperatur nimmt die allgemeine Proteinbiosynthese („house keeping“) wieder zu. Dagegen werden nach dem Kälteschock CIPs (*cold induced proteins*) verstärkt produziert. Die Kälteinduktion von Proteinen wurde bereits mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese in den verschiedenen Mikroorganismen wie *Bacillus subtilis* (Graumann und Marahiel, 1996, Lottering und Streips, 1995), *Bacillus stearothermophilus* (Wu und Welker, 1991), *Listeria* (Phan-Thanh und Gormon, 1995) und *Rhizobium* (Cloutier *et al.*, 1992) untersucht. Nach abgeschlossener Anpassung an die neue Temperatur wird die Induktion der CIPs zum Teil wieder gedrosselt (**Abb. 1.2-1**).



**Abb. 1.2-1:** Profil der Proteinbiosynthese von *B. subtilis* vor und nach einem Kälteschock

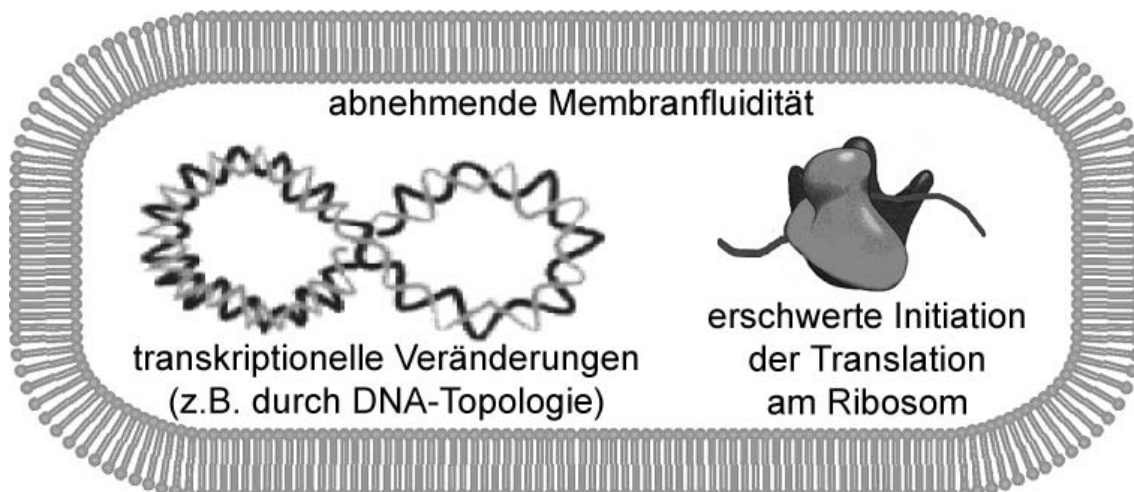
### 1.3 Betroffene Systeme nach einem Kälteschock

Sinkende Temperaturen stören die regulären Funktionen vieler intrazellulärer Prozesse. Dieses wurde bei der Untersuchung des mesophilen Bakteriums *E. coli* (Jones *et al.*, 1987) und des psychrotoleranten *Yersinia enterocolitica* (Neuhaus *et al.*, 2000) nach einem Kälteschock in Form eines temporären Wachstumsstopps beobachtet. Des Weiteren konnten Experimente mit strukturierten mRNAs zeigen, dass die Initiation der Translation bei niedrigen Temperaturen zu einem limitierenden Faktor für das Bakterienwachstum wird (Broeze *et al.*, 1978). Dabei wurde die Translationsinitiation maßgeblich durch kältestabile Sekundärstrukturen der mRNA behindert (Graumann *et al.*, 1997, Hall *et al.*, 1982, Jiang *et al.*, 1997, Wulff *et al.*, 1984). Folglich nimmt die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese bei niedrigen Temperaturen stark ab.

Ebenso ist das Bild des Transkriptomts nach einem Kälteschock stark verändert. Dieses kann über die genomweite Transkriptionsanalyse mittels DNA-Arrays observiert werden. Viele Gene sind reprimiert und wenige, die für Proteine kodieren, die am Anpassungsprozess an tiefe Temperaturen mitwirken, sind induziert. Dieses wurde in zahlreichen Studien für *E. coli* und *B. subtilis* nachgewiesen (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002, Phadtare und Inouye, 2004).

Bei sinkenden Temperaturen sind auch die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran betroffen. Bei niedrigen Temperaturen droht sie zu erstarren mit der Folge, dass die an die Membran gekoppelten Prozesse ihre Funktion verlieren und die Zelle schließlich lysiert (Aguilar *et al.*, 2001, Grau und de Mendoza, 1993, Klein *et al.*, 1999).

In **Abb. 1.3-1** sind die Konsequenzen, die für eine Zelle nach einem Kälteschock entstehen, schematisch dargestellt.



**Abb. 1.3-1:** Konsequenzen für die Zelle nach einem Kälteschock

Aus diesen Gründen haben Mikroorganismen eine Reihe von spezifischen Mechanismen entwickelt, um ihr Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu ermöglichen (Graumann und Marahiel, 1996, Weber und Marahiel, 2003). Diese Mechanismen werden nachfolgend näher beschrieben.

### 1.3.1 Initiation der Translation

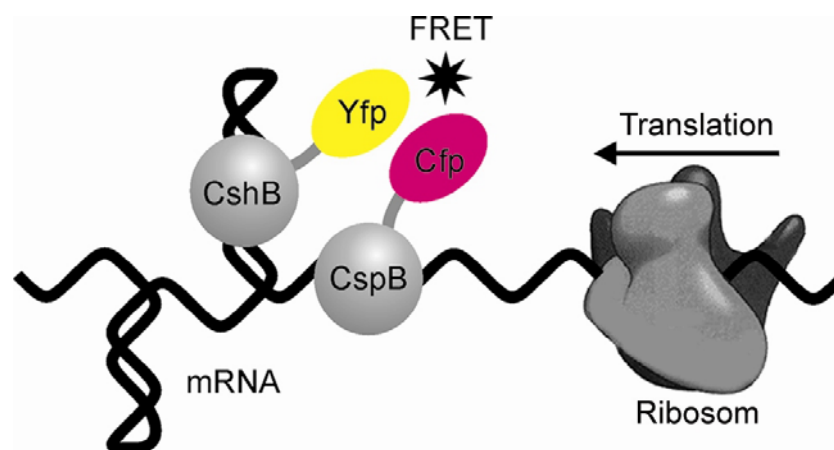
Sinkende Umgebungstemperaturen führen in Mikroorganismen zur Ausbildung von kältestabilisierten Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation behindern (Graumann *et al.*, 1997, Hall *et al.*, 1982, Jiang *et al.*, 1997, Wulff *et al.*, 1984). Des Weiteren ist bekannt, dass nach einem Kälteschock Systeme induziert werden, die zum einen fähig sind, Sekundärstrukturen unter Kälteschockbedingungen wieder aufzulösen und zum anderen diese aufgelösten Strukturen beizubehalten. Auf diese wird im Folgenden näher eingegangen.

Aus früheren Studien sind die auf Protein- und Transkriptionsebene kälteinduzierten CSPs (Beckering *et al.*, 2002, Graumann *et al.*, 1997, Kaan *et al.*, 2002) als RNA-bindende Proteine bereits charakterisiert worden (Graumann *et al.*, 1997). Diese nukleinsäurebindenden Eigenschaften gaben den Anstoß für die Entwicklung eines Modells der CSP aus *B. subtilis* als RNA-Chaperone (Graumann *et al.*, 1997). Dies konnte für CspA aus *E. coli* auch *in vitro* demonstriert werden (Jiang *et al.*, 1997). Demnach verhindert die unspezifische Bindung der CSP an mRNA die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation am Ribosom stören. Da die Stabilität der Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen zunimmt, ist dieser Prozess ein wichtiger Aspekt der Kälteschockantwort. Es sei hier schon darauf hingewiesen, dass die CSP nur einzelsträngige RNA binden können (Graumann und Marahiel, 1996) und deshalb keine schon vorhandenen mRNA-Sekundärstrukturen aufzulösen vermögen.

Für das Auflösen der bereits vorhandenen mRNA-Sekundärstrukturen ist die Klasse der DEAD-Box RNA-Helikasen zuständig. Diese Entwindungseigenschaft wurde in biochemischen Studien verschiedener Mikroorganismen bereits untersucht (Huang und Liu, 2002, Jones *et al.*, 1996, Kossen und Uhlenbeck, 1999, Rogers *et al.*, 1999, Tsu *et al.*, 2001, Tsu und Uhlenbeck, 1998, Yu und Owtrim, 2000). Die meisten Studien beschränkten sich dabei auf spektroskopische *in vitro* Assays von ATP-Hydrolyse durch nativ gereinigte Helikasen angeregt durch dsRNA. In *B. subtilis* sind zwei kälteinduzierte Proteine CshA und CshB als DEAD-Box RNA-Helikasen biochemisch charakterisiert worden (Hunger, 2006). Sie zeigten sowohl die charakteristische ATP-Hydrolyseaktivität als auch eine RNA-Entwindungsaktivität von dsRNA zu ssRNA.

Aus diesen Erkenntnissen wurde eine Zusammenarbeit der RNA-Helikasen mit den kälteinduzierten CSPs in einem Modell zur Initiation der Translation bei niedrigen Temperaturen postuliert **Abb. 1.3-2** (Hunger *et al.*, 2006). Dieses Modell konnte über Interaktionsstudien zwischen den Helikasen und den CSPs durch FRET *in vivo* gestützt werden (Hunger *et al.*, 2006).

Nach dem Modell bilden sich demnach nach einem Kälteschock mRNA-Sekundärstrukturen, die die Initiation der Translation behindern. Um diese auflösen zu können, destabilisieren die DEAD-Box RNA-Helikasen die unerwünschten Sekundärstrukturen. Die entwundene einzelsträngige mRNA kann nun durch die CSPs gebunden werden und so die Rückbildung der Sekundärstrukturen verhindern. So kann das Zusammenspiel aus Helikasen und CSPs die Initiation der Translation am Ribosom bei niedrigen Temperaturen gewährleisten.



**Abb. 1.3-2:** Modell zur Initiation der Translation am Ribosom (Hunger *et al.*, 2006)

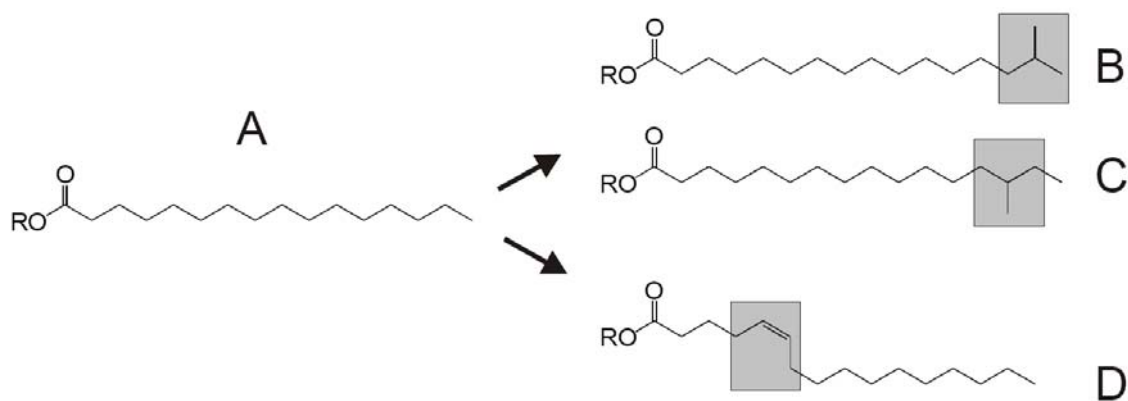
### 1.3.2 Membrananpassung

Die Membran besteht aus einer Doppelschicht von Phospholipiden und grenzt das Zellinnere von der Umwelt ab. Innerhalb dieser Phospholipiddoppelschicht sind zahlreiche Proteine integriert, die essentielle Funktionen ausüben. Dazu gehören unter anderem die Kontrolle über den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung, der Aufbau elektrischer Potentiale und die Atmungskette. Um diese komplexen Funktionen der Membranproteine aufrechterhalten zu können, ist die richtige Fluidität der Membran entscheidend. Diese wird jedoch durch die Temperatur beeinflusst. Mikroorganismen haben aus diesem Grund Mechanismen entwickelt, die die temperaturbedingte Änderung der Membranfluidität ausgleichen. Dazu wird die Zusammensetzung der Fettsäurereste, die Bestandteil der Phospholipide sind, verändert. Bei sinkender Temperatur werden die Fettsäurereste so modifiziert, dass die Van-der-Waals-

Anziehung zwischen ihnen verringert wird, wodurch der Schmelzpunkt der Membran sinkt. Das geschieht zum einen durch die Einführung von *cis*-Doppelbindungen in die bestehenden Fettsäurereste. Dadurch wird das lineare Kohlenstoffgerüst abgelenkt und so die Van-der-Waals-Interaktion zwischen ihnen vermindert. Zum anderen werden verzweigt-kettige Fettsäurereste neu für die Membran synthetisiert, die ebenfalls schwächere Anziehungskräfte untereinander bedingen (**Abb. 1.3-3**). Diese genannten Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Membran von kältegeschockten Bakterien wurden in verschiedenen Experimenten untersucht (Aguilar *et al.*, 1998, Kaneda, 1991, Klein *et al.*, 1999, Weber *et al.*, 2001).

In *B. subtilis* werden verzweigt-kettige Fettsäurereste für die Membrananpassung nach Kälteschock *de novo* synthetisiert (Klein *et al.*, 1999). Die Synthese verläuft unter Verwendung von  $\alpha$ -Ketosäuren (Kaneda, 1977, Kaneda, 1991), die durch den Katabolismus von Isoleucin hergestellt werden. In diesem Zusammenhang ist es nachvollziehbar, dass gerade auch das *bkd*-Operon kälteinduziert ist (Kaan *et al.*, 2002), da es für die Enzyme des Isoleucinkatabolismus zur Herstellung der  $\alpha$ -Ketosäuren kodiert.

Die Modifikation von gesättigten zu ungesättigten Fettsäureresten in der Membran von *B. subtilis* wird durch die Fettsäure-desaturase Des vorgenommen (Aguilar *et al.*, 1998, Weber *et al.*, 2001). Die Endprodukte dieses Membranproteins sind ausschließlich  $\Delta 5$ -ungesättigte Fettsäurereste (Altabe *et al.*, 2003). Reguliert wird diese Fettsäure-desaturase ausschließlich durch das kälteinduzierte Zweikomponentensystem DesKR (Beckerling, 2004). Die Erkennung des Kältesignals verläuft über die membrangebundene Histidinkinase DesK und die Weiterleitung dieses Signals erfolgt durch den cytosolischen Responsregulator DesR, der die Transkription des Desaturasegens *des* aus *B. subtilis* aktiviert.



**Abb. 1.3-3:** Anpassung der Fettsäurereste nach einem Kälteschock

(A) neo-C16, (B) iso-C16, (C) anteiso-C16, (D) C16:1 $\Delta 5$ -cis



In Deletionsstudien zu dem System der Membrananpassung über die Desaturierung der Fettsäurereste durch die Desaturase Des wurde nur in dem *B. subtilis* Stamm JH642 ein kältesensitiver Phänotyp der *des* Mutante beobachtet (Weber *et al.*, 2001). Die Deletion von *des* im Wildtypstamm MR168 hatte jedoch keine Auswirkungen auf das Wachstum nach einem Kälteschock (Aguilar *et al.*, 1998). Des Weiteren wurde beobachtet, dass der Stamm JH642 generell nach einem Kälteschock einen Wachstumsdefekt aufweist. Dieser zeigt sich durch die Lyse der Zellen einige Stunden nach dem Kälteschock. Der Defekt konnte durch die Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium des JH642 aufgehoben werden. Isoleucin ist ein Zwischenprodukt, das in der Biosynthese von anteiso-verzweigten Fettsäuren über die  $\alpha$ -Ketosäuren als Substrat verwendet wird. Auch die Zugabe von Vor- und Folgeprodukten des Isoleucins im Biosyntheseweg der anteiso-verzweigten Fettsäuren konnte den beobachteten Wachstumsdefekt wieder aufheben. Somit sind sowohl Isoleucin als auch die Zwischenprodukte des Biosyntheseweges zu den anteiso-verzweigten Fettsäuren kälteprotektiv für den Stamm JH642. Der uncharakterisierte Defekt des JH642 müsste somit im Biosyntheseweg der anteiso-verzweigten Fettsäuren lokalisiert sein (Klein *et al.*, 1999).

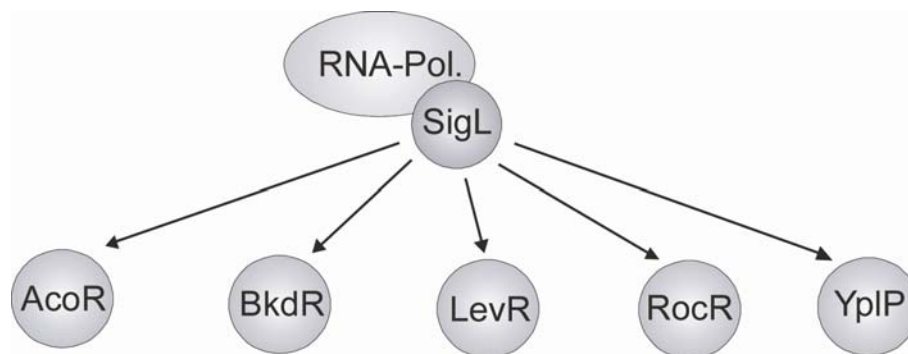
### 1.3.3 $\sigma^L$ -abhängige Transkriptionsaktivatoren

Die Transkription wird bei niedrigen Temperaturen stark beeinflusst, da es für die Anpassung des *B. subtilis* wichtig ist, die nicht kälterelevanten Gene weniger und die für die Anpassung wichtigen Gene verstärkt zu transkribieren (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002, Phadtare und Inouye, 2004). Dies kann über die Untersuchung des Transkriptoms mittels DNA-Arrays beobachtet werden.

In Transkriptionsstudien von *B. subtilis* sind Gene wie z.B. das Gen *yplP* als stark induziert (8,1x) nach einem Kälteschock gefunden worden (Beckering *et al.*, 2002). Eine Datenbankanalyse durch BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) zeigte eine signifikante Homologie von YplP zu Transkriptionsregulatoren aus der *E. coli* NtrC/NifA Familie. *B. subtilis* hat insgesamt fünf Homologe dieser Familie von denen vier bislang beschrieben wurden (**Abb. 1.3-4**). Dazu gehören AcoR (31% Identität, 48% Ähnlichkeit) (Huang *et al.*, 1999), BkdR (32% Identität, 50% Ähnlichkeit) (Debarbouille *et al.*, 1999), LevR (25% Identität, 43% Ähnlichkeit) (Debarbouille *et al.*, 1991) und RocR (31% Identität, 47% Ähnlichkeit) (Calogero *et al.*, 1994). Allen gemeinsam ist die  $\sigma^L$ - ( $\sigma^{54}$ -) abhängige Transkriptionsaktivierung von Operons, die im Kohlehydratmetabolismus oder Aminosäurekatabolismus beteiligt sind. Ein Sequenzvergleich von YplP zeigt sowohl die gut konservierte

$\sigma^{54}$ -Interaktionsdomäne als auch ein C-terminales Bindemotiv. Dagegen fehlt in YpIP die N-terminale Domäne, die in den anderen  $\sigma^L$ -/ $\sigma^{54}$ -Aktivatoren für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Shingler, 1996). Durch Deletionsstudien gekoppelt mit Wachstumsanalysen konnte die Kälterelevanz des putativen Transkriptionsaktivators YpIP gezeigt werden (Beckering *et al.*, 2002). Aufgrund dieser gezeigten Kälterelevanz und seiner achtfachen Induktion auf Transkriptionsebene, sowie der signifikanten Sequenzhomologie zu den anderen  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren, besteht die Möglichkeit, dass YpIP ein Regulator für bisher unbekannte Gene ist, die an der Kälteanpassung von *B. subtilis* beteiligt sein könnten. Weiterhin ist bekannt, dass der Transkriptionsregulator BkdR die Transkription des *bkd*-Operons aktiviert. Dieses kodiert für Enzyme, die an der Umsetzung von Isoleucin zu den  $\alpha$ -Ketosäuren beteiligt sind. Die  $\alpha$ -Ketosäuren dienen als Vorläufer für die Synthese von verzweigtkettigen Fettsäuren. Diese werden in die Membran eingebaut und gewährleisten so die Aufrechterhaltung ihrer Fluidität bei niedrigen Temperaturen (Abschnitt 1.3.2). Folglich könnte ebenso der Aktivator BkdR eine wichtige Rolle in der Kälteanpassung von *B. subtilis* spielen.

Da alle  $\sigma^L$ - ( $\sigma^{54}$ -) abhängigen Transkriptionsregulatoren zusammen mit  $\sigma^L$  ( $\sigma^{54}$ ) die Transkription ihrer Target-Gene aktivieren, ist auch die Beteiligung des  $\sigma^L$ -Faktors an der Anpassung von *B. subtilis* nach einem Kälteschock wahrscheinlich.



**Abb. 1.3-4:** Übersicht der  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren

## 1.4 Aufgabenstellung

Mikroorganismen erfahren durch sich ständig ändernde Umweltbedingungen Stresssituationen. Diese muss von der Zelle mit der entsprechenden Stressantwort beantwortet werden. Um die komplexe Zellphysiologie der Mikroorganismen an die neuen Bedingungen anpassen zu können, ist es wichtig die Veränderung in der Umgebung wahrzunehmen und die

passende Stressantwort zu initiieren. Hierbei kann es sich entweder um eine direkte Wahrnehmung oder eine indirekte durch die sich aus den veränderten Umweltbedingungen resultierenden Konsequenzen handeln. Für das umfassende Verständnis der Anpassungsreaktion eines Mikroorganismus sind also Kenntnisse über die Stresswahrnehmung und Signalweiterleitung notwendig.

In dieser Arbeit sollen aktuelle Techniken der Proteom- und Transkriptionsanalyse verwendet werden, um die Kälteschockantwort von *B. subtilis* näher zu untersuchen. Die Erkenntnisse aus den geplanten Experimenten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und DNA-Arrays an kältegeschocktem *B. subtilis* JH642 sollen für die Entwicklung weiterführender Projekte über einzelne kältespezifische Regulations- und Anpassungssysteme genutzt werden. Dabei soll insbesondere die Regulation und Funktion von bislang uncharakterisierten kälteinduzierten Genen und Proteinen untersucht werden, um das derzeitige Bild der Kälteschockantwort von Mikroorganismen zu erweitern.

Des Weiteren sollte der aus Vorarbeiten hervorgegangene auf Transkriptionsebene stark kälteinduzierte  $\sigma^L$ -abhängige Transkriptionsaktivator YpIP untersucht werden. Hierbei sollten mittels genomweiter Transkriptionsanalyse (DNA-Arrays) die von YpIP regulierten Gene identifiziert werden. Durch einen EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) sollte die Interaktion zwischen YpIP, SigL und der identifizierten putativen Target-DNA nachgewiesen werden. Dadurch kann zum einen gezeigt werden, dass YpIP wirklich ein  $\sigma^L$ -abhängiger Transkriptionsaktivator ist, und zum anderen, dass die aus den Arrays erhaltenen Gene wirklich von YpIP und SigL reguliert werden. Hierzu muss zuvor ein Modellsystem des Assays mit BkdR, SigL und der bekannten Target-DNA (*bkd*-Operon) etabliert werden, um dieses dann auf YpIP übertragen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenso geklärt werden, welche weiteren  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren für die Kälteanpassung von *B. subtilis* relevant sein könnten. Ebenso sollte auch der  $\sigma^L$ -Faktor in Bezug auf seine Kälterelevanz hin untersucht werden. Dieses sollte durch Deletionsstudien und Wachstumsanalysen gezeigt werden. Die mögliche Relevanz des  $\sigma^L$ -Faktors und eines weiteren Transkriptionsaktivators ist nahe liegend, da bereits bekannt ist, dass  $\sigma^L$  zusammen mit BkdR die Transkription des *bkd*-Operons steuert. Dieses kodiert für Enzyme, die an der Membrananpassung über anteiso-verzweigte Fettsäuren beteiligt sind. Die Relevanz von BkdR und  $\sigma^L$  für die Anpassung von *B. subtilis* nach einem Kälteschock ist demnach wahrscheinlich.

Der in Vorarbeiten von Klein *et al.* gezeigte Wachstumsdefekt des JH642 nach einem Kälteschock sollte in dieser Arbeit lokalisiert und charakterisiert werden. In früheren Arbeiten

wurde bisher postuliert, dass dieser uncharakterisierte Defekt im Biosyntheseweg zu den verzweigtkettigen Fettsäuren lokalisiert sein könnte. Deshalb sollte dieser putativ defekte Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Fettsäuren des Stammes JH642 näher untersucht werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
1D-PAGE-Apparatur	<i>BioRad</i> Mini-Protean 3 Electrophoresis System
2D-PAGE-Kammer	<i>BioRad</i> Protean Plus Dodeca Cell
2D-PAGE-IEF	<i>Pharmacia</i> Multiphor II
Analysenwaagen	<i>Sartorius</i>
Array-Scanner	<i>PerkinElmer</i> ScanArray Express Microarray Scanner
Autoklav	<i>Tuttnauer</i> 5075 ELV
Bioanalyzer (Lab-on-Chip)	<i>Agilent Technologies</i> 2100 Bioanalyzer
Brutschrank	<i>Köttermann</i> 2736
Clean-Bench	<i>Antair</i> BSK
DNA-Agarosegel- Dokumentation	<i>Cybertech</i> CS 1 Videokamera <i>Mitsubishi</i> Video Copy Processor Thermodrucker
Drehschieberölpumpe	<i>Vacuubrand</i> RZ 5
Elektroporator	<i>Biorad</i> Gene Pulser II
FPLC	<i>Pharmacia</i> Äkta prime
Fluidizer	<i>Avestin</i> EmulsiFlex-C5
Gefriertrockner	<i>Leybold-Heraeus</i> GT2
Kugelmühle	<i>B. Braun Biotech</i>
Kulturröller	<i>New Brunswick Scientific</i> TC-7
Kühlfalle	<i>Uniequip</i> Unicryo MC 2L -60°C
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series 25, Innova 4230, Innova 4300 <i>Invors</i> Multitron, Unitron
Mikroplattenleser	<i>Perkin Elmer</i> Viktor V2 Microplate Analyzer
Netzgeräte	<i>BioRad</i> PowerPac 3000 <i>Pharmacia</i> EPS 3501 XL <i>Bandelin</i> Sonoplus HD 200
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Phosho-/Fluoro-Imager	<i>Amersham</i> Strom 860
Pipetten	<i>Gilson</i> <i>Eppendorf</i>
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal <i>Perkin Elmer</i> GeneAmp PCR-System 9700, GeneAmp PCR-

	System 2400
Slide Booster	<i>Implen</i> Slide Booster
	<i>Adobe</i> Photoshop 7.0
	<i>Agilent (Silicon Genetics)</i> GeneSpring GX 7.3
	<i>Amersham</i> Image Quant 5.2
	<i>Corel</i> Draw 8.0
Software	<i>Decodon</i> Delta2D V3.1
	<i>GATC</i> Lasergene DNASTar 5.0
	<i>PerkinElmer</i> ScanArray Express Software
	<i>Microsoft</i> Office XP
	<i>Molecular Dynamics</i> Image Quant 5.2
Spektrophotometer	<i>Peqlab</i> NanoDrop ND-1000
SpeedVak	<i>Uniequip</i> Univapo 150
Thermoblock	<i>Techne</i> Dri-Block <sup>®</sup> DB2A
Thermoschüttler	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Compact
Ultraschallsonde	<i>Bandelin</i> elektronik UW 200
UV/VIS-Spektrometer	<i>Pharmacia</i> Ultrospec 3000
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Vortex</i> Vibrofix VF1 Electronic
	<i>Heidolph</i> Reax Top
Wasserschüttler	<i>Infors</i> Aquatron Rundschüttelmaschine
Wasserentionisierer	<i>Seral</i> Seralpur Pro 90 CN
	<i>Haraeus</i> Biofuge Pico, Megafuge 1.0R, Minifuge RF
Zentrifugen	<i>Sorvall</i> RC 26 Plus und RC 5B Plus mit Rotoren SS-34 und SLA-3000

## 2.2 Enzyme, Chemikalien und Kits

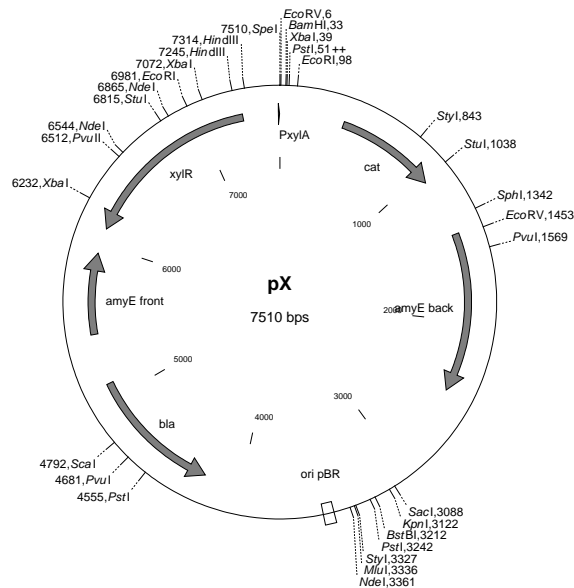
Alle nachfolgend nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Sigma* (Deisenhofen) oder *Aldrich* (Steinheim) in *p.a.* Qualität bezogen:

Hersteller (Herkunft)	Produkt(e)
<i>Amersham Pharmacia Biotech</i> (Freiburg)	Nylonmembran Hybond N <sup>+</sup> , ECF-Substrat, Antibiotika, <i>IPG-Strips</i> , Carrier-Ampholyte, Proteinkinase K, Lysozym, <i>IPG-Strips</i> , DryStrip-Cover Fluid, [ <sup>35</sup> S]-Methionin, CyScribe GFX Purification Kit, Cy3-dUTP + Cy5-dUTP (je 5x25nmol)
<i>Ambion Incorporated</i> (Woodward, USA)	RNAZap, T7-RNA-Polymerase Kit
<i>Agilent Technologies</i> (Böblingen)	RNA 6000 Nano Series II Kit
<i>Biomol</i> (Ilvesheim)	DTT, CHAPS [3-((3-Cholamidopropyl)-di-

	methyllammino)-1-propane-sulfonate]
<i>Boehringer Mannheim</i> (Mannheim)	RNase A, DNase 1, Expand <sup>TM</sup> Long Template PCR System
<i>Difco</i> (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Nutrient Broth, Casamino acids
<i>Eurogentec</i> (Belgien)	Agarose, <i>Bacillus subtilis</i> Micro-Arrays, Primer Mix <i>Bacillus subtilis</i> (5 pmol), Elektroporationsküvetten
<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)	PageRuler Protein-Marker
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	TMEDA, SDS
<i>Implen</i> (München)	Lifter slips für <i>B. subtilis</i> arrays (22x40 mm) Advahum für slide booster Advason für slide booster
<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)	Platinum <sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase, SuperScript II Reverse Transkriptase
<i>Kodak</i> (Rochester, USA)	Röntgenfilm Biomaxx MR, D-19 Entwickler
<i>Millipore</i> (Molsheim)	Sterilfilter (0,20 µm Porengröße), Whatman 3MM Filterpapier, Amicon Ultra-15 Ultracel
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)	T4 DNA Ligase, Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker, Phusion <sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase, Deoxynucleotide Solution Set
<i>Ocimum Biosolutions</i> (Ebersberg)	Hybridisation buffer for cover slips
<i>Operon</i> (Huntsville, USA)	synthetische Oligonukleotide (Primer)
<i>Oxoid</i> (Wesel)	Bactotrypton, Agar Nr. 1
<i>Qiagen</i> (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, QIAquick-spin PCR Purification Kit, Plasmidpräparationskit, RNeasy Mini Kit (50)
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Harnstoff, Glycin, Isopropanol
<i>Serva</i> (Heidelberg)	Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulfat
<i>Sigma</i> (Deisenhofen)	Bromphenolblau, Arabinose
<i>Stratagene</i> (La Jolla, USA)	<i>Arab. thaliana</i> mRNA spike 3 ( <i>rbcL</i> )

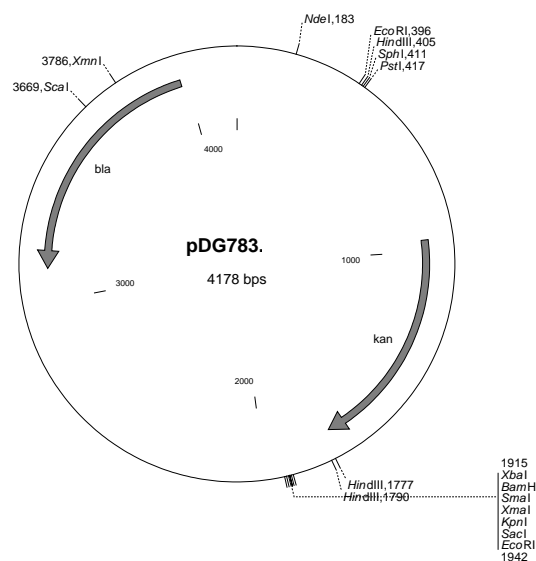
## 2.3 Vektoren

### 2.3.1 pX



Der pX Vektor dient zur Integration von Genen in das *amyE* Gen von *B. subtilis* und deren kontrollierte Expression durch einen Xylose induzierbaren Promotor (Kim *et al.*, 1996). Dazu wurde zwischen die 5' und 3' Enden von *amyE* das Xyloserepressor codierende *xylR* Gen und der Promotor von *xylA* aus *Bacillus megaterium* positioniert. Ein Replikationsursprung für *E. coli* und das Ampicillinresistenzgen *bla* aus pBR322 (Sutcliffe, 1979) ermöglichen die Klonierung und Selektion in *E. coli*.

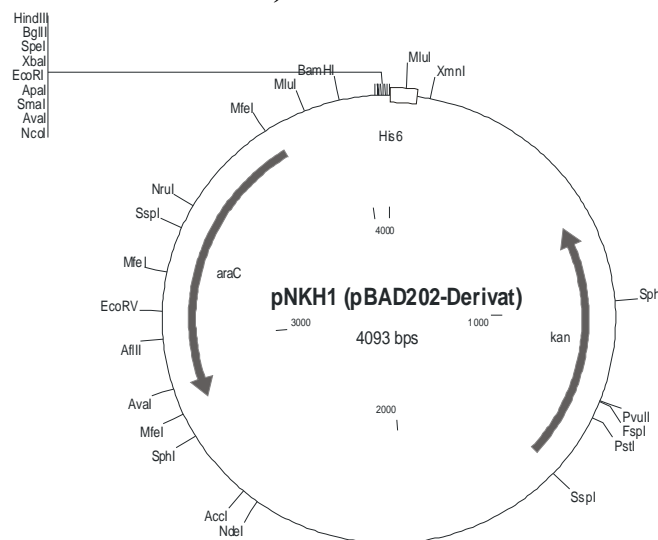
### 2.3.2 pDG783





Der pDG783 Vektor gehört zu einer Serie von Plasmiden, die unterschiedliche Resistenzkassetten für die Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen (Guerout-Fleury *et al.*, 1995). Die von dem *bla* Gen kodierte  $\beta$ -Lactamase verleiht die Ampicillinresistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli*. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen vor und nach der Kanamycinkassette erlauben eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten des Resistenzgens für die Selektion auf Kanamycin in *B. subtilis*.

### 2.3.3 pNKH1 (pBAD-TOPO-Derivat)



Der pNKH1 ist ein Derivat des pBAD202/D-TOPO Vektors (*Invitrogen*) und wurde für die rekombinante Genexpression verwendet. Die Integration der DNA (*pBAD Directional TOPO Expression Kit*) führt zur Fusion mit einer N-terminalen HP-Thioredoxin Domäne zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit und einem C-terminalen His<sub>6</sub>-tag für die effektive Proteinreinigung. Bei dem pNKH1 wurde jedoch die N-terminale HP-Thioredoxin Domäne entfernt. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des Arabinose induzierbaren *araBAD* Promotors, dessen Regulatorprotein AraC ebenfalls von dem Plasmid kodiert wird (Guzman *et al.*, 1995). Eine Erkennungsstelle für eine Enterokinase erlaubt das Abspalten der N-terminalen Domäne. Ein C-terminales V5 Epitop ermöglicht zusätzlich die Proteindetektion mit Anti-V5 Antikörpern (Southern *et al.*, 1991). Der pUC Replikationsursprung sorgt für die *low-copy* Replikation in *E. coli* auf die mit Kanamycin selektiert werden kann.

## 2.4 Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Quelle (Literatur)
<u><i>Bacillus subtilis</i></u>		
MR168	<i>trpC2</i>	(Anagnostopoulos und Spizizen, 1961)
JH642	<i>pheA1, trpC2, sfp<sup>0</sup></i>	(Hoch und Mathews, 1973)
CB15	JH642 <i>yplP::kan</i>	(Beckering, 2004)
FW6	JH642 <i>sigL::kan</i>	Diese Arbeit
FW7	MR168 <i>yplP::kan</i>	Diese Arbeit
FW9	MR168 <i>acoR::aphA3</i>	Diese Arbeit
FW10	JH642 <i>bkdR::aphA3</i>	Diese Arbeit
FW11	JH642 <i>yjlC::kan</i>	Diese Arbeit
FW12.1	JH642 <i>amyE::bkdR<sub>JH642</sub></i>	Diese Arbeit
FW12.2	JH642 <i>amyE::bkdR<sub>MR168</sub></i>	Diese Arbeit
FW13	JH642 <i>acoR::aphA3</i>	Diese Arbeit
FW14	JH642 <i>levR::aphA3</i>	Diese Arbeit
FW15	JH642 <i>rocR::aphA3</i>	Diese Arbeit
FW17	JH642 <i>amyE::ilvB ilvH<sub>MR168</sub></i>	Diese Arbeit
FW18	JH642 <i>amyE::ilvB ilvH<sub>JH642</sub></i>	Diese Arbeit
FW19	JH642 <i>yplP::kan amyE::yplP</i>	Diese Arbeit
FW20	JH642 <i>yplP::kan amyE::yplP yplQ</i>	Diese Arbeit
FW23	JH642 <i>ybaE::kan</i>	Diese Arbeit
FW24	JH642 <i>ydhM::kan</i>	Diese Arbeit
FW25	JH642 <i>ysbA::mls</i>	Diese Arbeit
FW26	JH642 <i>ywaC::kan</i>	Diese Arbeit
FW27	JH642 <i>yshA::mls</i>	Diese Arbeit
FW28	JH642 <i>yscB::mls</i>	Diese Arbeit
JW1	JH642 <i>yvyD::kan</i>	(Wiesner, 2006)
QB5173	MR168 <i>levR::aphA3</i>	(Martin-Verstraete <i>et al.</i> , 1994)
QB5505	MR168 <i>sigL::aphA3</i>	(Debarbouille <i>et al.</i> , 1991)
QB5533	MR168 <i>rocR::aphA3</i>	(Calogero <i>et al.</i> , 1994)
QB7511	MR168 <i>bkdR::aphA3 (amyE::ptb'-lacZ)</i>	(Debarbouille <i>et al.</i> , 1999)
QB7512	MR168 <i>bkdR::aphA3</i>	(Debarbouille <i>et al.</i> , 1999)
QB7704	MR168 <i>acoR::aphA3 (amyE::acoA-lacZ)</i>	(Ali <i>et al.</i> , 2001)

*Escherichia coli*

BL21	<i>E. coli</i> B F <sup>-</sup> <i>dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> <i>Stratagene</i> F <sup>+</sup> { <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>Tn10</i> (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> D( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15	
Top10	Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 D (ara</i> - <i>leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	<i>Invitrogen</i>
FW-Exp1	pNKH1 mit <i>bkdR</i>	Diese Arbeit
FW-Exp2	pNKH1 mit <i>sigL</i>	Diese Arbeit
FW-Exp3	pNKH1 mit <i>yplP</i>	Diese Arbeit
FW-Exp4	pNKH1 mit <i>ilvB</i> (MR168)	Diese Arbeit
FW-Exp5	pNKH1 mit <i>ilvB</i> * (JH642)	Diese Arbeit
FW-Exp6	pNKH1 mit <i>ilvH</i> (JH642)	Diese Arbeit

**2.5 Medien**

Als Vollmedium zur Anzucht von *E. coli* diene LB-Medium (Short *et al.*, 1988). SMM-Medium (Cutting und Van der Horn, 1990) wurden als Minimalmedium für *B. subtilis* eingesetzt. DSM-Medium (Schaeffer *et al.*, 1965) wurde zur Sporulation bei *B. subtilis* verwendet.

**LB-Medium**

Hefeextrakt	10 g/L
Bactotrypton	10 g/L
NaCl	5 g/L
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

**DSM-Medium**

Nutrient Broth	8 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,12 g/L
KCl	1 g/L
NaOH (1 M)	0,6 mL/L
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

Nach dem Autoklavieren wurden je 600 mL Medium mit jeweils 1 mL der folgenden Lösungen versetzt:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 M
MnCl <sub>2</sub>	0,1 M
FeSO <sub>4</sub>	1 mM

Als Medium für die Wachstumskurven der verschiedenen *B. subtilis* Mutanten diene SMM-Medium:

#### **10x SMM-Medium**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	183,4 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g/L
Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O	10 g/L
MgSO <sub>4</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	3,8 g/L

#### **SMM-Medium**

10x SMM-Medium	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	900 mL

Als Kohlenstoffquelle diene 50 % sterile Glukose-Lösung in einer Konzentration von 10 mL/L. Da die *Bacillus subtilis* Stämme MR168 und JH642 Auxotrophien besitzen, wurde für den MR168 Tryptophan und für den JH642 Tryptophan und Phenylalanin in einer Endkonzentration von 5 mg/mL dem Medium steril zugefügt.

Für die Messungen in der Kälte ist es nur für *B. subtilis* JH642 notwendig Isoleucin dem Minimalmedium in einer Endkonzentration von 5 mg/mL steril hinzuzufügen (Klein *et al.*, 1999).

#### **Zusätze**

Glukose	0,5 % (w/v)
Fruktose	0,5 % (w/v)
Xylose	0,5 % (w/v)
Tryptophan	5 µg/mL
Phenylalanin	5 µg/mL
Isoleucin	5 µg/mL
Spurenelemente	0,1 mL

#### **Spurenelemente in ddH<sub>2</sub>O**

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,6 mg
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,6 mg
ZnCl <sub>2</sub>	1,7 mg
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1 mg
CaCl <sub>2</sub>	5,5 mg
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,43 mg
FeCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	13,5 mg
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	125 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

## 2.6 Antibiotika-Zusätze

Zur Herstellung fester Nährmedien wurde die Lösung vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt. Die Sterilisation der Medien erfolgte durch 20 minütiges Autoklavieren bei 122 °C und 1,5 bar. Antibiotika und andere hitzesensitive Zusätze wurden nach Abkühlung auf 50 °C in folgenden Konzentrationen steril zum Medium gegeben:

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 µg/mL ( <i>E. coli</i> )
Chloramphenicol	5 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )
Erythromycin	1 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )
Kanamycin	25 µg/mL ( <i>E. coli</i> )
	10 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )
Lincomycin	25 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )
Spectinomycin	100 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )
Tetracyclin	20 µg/mL ( <i>B. subtilis</i> )

### 3. Methoden

#### 3.1 Allgemeiner Teil

Alle durchgeführten Arbeitsschritte wurden, sofern dies erforderlich war, unter sterilen Bedingungen ausgeführt, ohne dass dies bei der Beschreibung jeder Methode explizit angegeben wird. Dies gilt insbesondere für die Herstellung von Medien, die Anzucht von Bakterienkulturen, molekularbiologisches und proteinchemisches Arbeiten.

##### 3.1.1 Anzucht von *Bacillus subtilis* in SMM-Minimalmedium (SMM)

Zur Anzucht von *B. subtilis* waren für präparative Ansätze und Wachstumskurven Endkulturvolumina von 200 mL erforderlich. Die Herstellung dieser Kulturen erfolgte jeweils in 2 Stufen: frisch hergestelltes auf 37 °C vorgewärmtes SMM-Medium wurde mit einer 37 °C-Übernachtskultur (ÜNK) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Als Berechnungsgrundlage wurde folgende Formel verwendet:

$$ml(Animpfen) = \frac{ml(Medium)}{OD(ÜNK)} \cdot OD(soll)$$

Zum Animpfen der ÜNK wurde *B. subtilis* entweder direkt von einer DSM-Agarplatte oder aus einem –78 °C Glycerin-Stock entnommen. Die Kulturen wurden im Wasserschüttler inkubiert (225 Upm, 37 °C) bis die gewünschte OD<sub>600</sub> von 0,45-0,5 erreicht war. Sie konnten für Wachstumskurven oder Kälteschockexperimente verwendet werden.

##### 3.1.2 Aufnahme von Wachstumskurven

Die Aufnahme von Wachstumskurven dient der zeitlichen Verfolgung des Wachstumsverlaufs einer Bakterienkultur. Außerdem kann das Wachstumsverhalten unter Stressbedingungen gemessen werden. Dazu wurden den wachsenden Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeiten jeweils 1 mL Proben entnommen, und die optische Dichte mit Hilfe eines UV/VIS-Spektrometers bei 600 nm gemessen. Auf Grund einer gerätespezifischen Eigenschaft des UV/VIS-Spektrometers wurde ab einer OD<sub>600</sub> von 0,8 die Messungenaugigkeit so groß, dass bei höheren optischen Dichten eine 1:10-Verdünnung verwendet wurde. Eine Auftragung der OD<sub>600</sub> gegen die Zeit, liefert die gewünschte Wachstumskurve.

### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und Proteinen

Die Konzentration von Plasmid-, PCR-DNA, präparierter RNA und gereinigten Proteinen wurde mit Hilfe des NanoDrop der Firma *Peqlab* bestimmt (Abschnitt 2.1).

## 3.2 Arbeiten mit DNA

### 3.2.1 Präparation von chromosomaler DNA aus *Bacillus subtilis*

Für die Präparation kleinerer Mengen chromosomaler DNA wurde nach folgender Methode vorgegangen:

2 mL einer Übernachtskultur in LB-Medium (gegebenenfalls mit Antibiotika) wurden zentrifugiert (10 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 mL B1-Puffer suspendiert. Die Lösung wurde mit 20 µL Lysozym-Lösung (100 mg/mL) und 45 µL Proteinase K-Lösung (20 mg/mL) versetzt und inkubiert (1 h, 37 °C). Durch das Lysozym wird die bakterielle Zellwand abgebaut und die Zellen protoplastiert. Die im B1-Puffer enthaltenen Detergenzien führen dann zur vollständigen Lyse der Zellen. Die klare viskose Lösung wurde mit 350 µL B2-Puffer versetzt, kurz vortexiert und weiter inkubiert (15 min, 37 °C). Das Lysat wurde wiederum mit 1,5 mL QBT-Puffer versetzt, mindestens 20 sec auf höchster Stufe vortexiert und umgehend auf eine vorher mit 2 mL QBT-Puffer äquilibrierte *QIAGEN tip20*-Anionentauschersäule überführt. Anschließend wurde zweimal mit je 2 mL QC-Puffer gewaschen und die chromosomale DNA mit 2 mL QF eluiert. Um die DNA auszufällen, wurde die Lösung mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und zentrifugiert (13000 Upm, 30 min, RT). Das Pellet wurde mit 70 % EtOH *p.a.* gewaschen und in der SpeedVac getrocknet. Die DNA wurde in 200 µL EB-Puffer aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

#### **B1**

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	50 mM
Triton X-100	0,5 % (w/v)
Tween-20	0,5 % (w/v)

#### **B2**

GuHCl	3 M
Tween-20	20 % (v/v)

**QBT**

NaCl	750 mM
MOPS, pH 7,0	50 mM
Ethanol	15 % (v/v)
Triton X-100	0,15 % (v/v)

**QC**

NaCl	1 M
MOPS, pH 7,0	50 mM
Ethanol	15 % (v/v)

**QF**

NaCl	1,25 M
MOPS, pH 7,0	50 mM

**EB**

Tris pH, 8,5	10 mM
--------------	-------

**Lysozym** 10 % (w/v)

**Proteinase K** 2 % (w/v)

### 3.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Hitzestabile DNA-Polymerasen werden in der Polymerasekettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987) verwendet, um mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden (Primer), die komplementär zu den flankierenden DNA-Bereichen sind, und Matrizen-DNA (Templat) ein DNA-Fragment zu amplifizieren und so zu vervielfältigen. Die Reaktion erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten, nämlich die Denaturierung der Templat-DNA, die Hybridisierung der Primer mit der Templat-DNA (*Annealing*) und ausgehend von den Primern die 5'-3' Polymerisation der neuen DNA.

Die Sequenz der Primer sollte so gewählt werden, dass sie eine Länge zwischen 19 und 30 Basenpaaren und möglichst gleiche Hybridisierungstemperaturen besitzen. Entscheidend für die Hybridisierungstemperatur ist der GC-Gehalt sowie die Länge des Primers. Diese Temperatur lässt sich durch die Formel

$$T = 69,3 + 0,41 \cdot x \cdot \left( \frac{100 - 2 \cdot GC}{100} \right) - \frac{650}{Zahl \text{ der Basen}}$$

berechnen. Zu beachten ist, dass der Primer keine invertierten Sequenzen besitzt, die unter Umständen zu einer Schleifenbildung innerhalb des Primers führen können.



Für die Reaktion steht eine Reihe von kommerziellen Polymerasen zur Auswahl, die sich in Geschwindigkeit und Ablesegenauigkeit unterscheiden.

In dieser Arbeit wurde das Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR-Kit von *Boehringer Mannheim*<sup>®</sup>, das aus einem Enzym-Mix der Taq- und Pwo-DNA-Polymerase besteht, der Platinum<sup>®</sup> Pfx DNA Polymerase der Firma *Invitrogen* und die Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase von *New England Biolabs* verwendet. Die typischen Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

#### **Taq- / Pwo-Reaktionsansatz (20 µL)**

DNA-Templat	0,025-2,5 ng
5'-Primer (5 pmol/µL)	2 µL
3'-Primer (5 pmol/µL)	2 µL
PCR-Mix 3	14 µL

#### **PCR-Mix 3**

10x Puffer 3	75 µL
Taq/Pwo Polymerase-Mix	7,5 µL
dNTP's (2 mM)	75 µL
ddH <sub>2</sub> O	512,5 µL

#### **10x Puffer 3**

Tris/HCl, pH 9	500 mM
NH <sub>4</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	160 mM
MgCl <sub>2</sub>	22,5 mM
DMSO	20 % (v/v)
Tween 20	1 % (v/v)

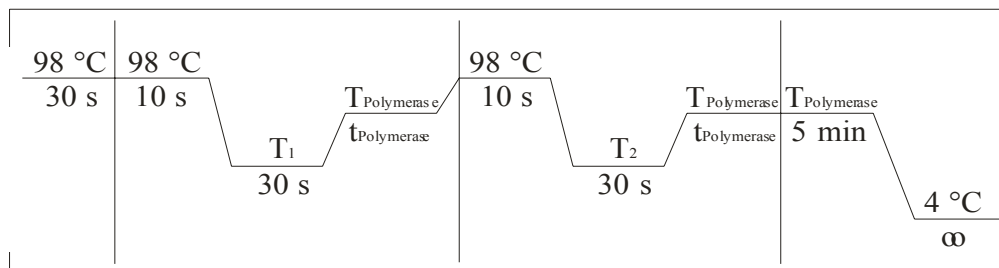
#### **Phusion<sup>TM</sup>-Reaktionsansatz (50 µL)**

DNA-Templat	0,025-2,5 ng
5'-Primer (5 pmol/µL)	5 µL
3'-Primer (5 pmol/µL)	5 µL
5x HF Puffer	10 µL
dNTP's (2 mM)	5 µL
DMSO	1 µL
Phusion Pol.	0,5 µL

#### **Pfx-Polymerase-Reaktionsansatz (50 µL)**

DNA-Templat	0,025-2,5 ng
5'-Primer (5 pmol/µL)	2 µL
3'-Primer (5 pmol/µL)	2 µL
10x Puffer	5 µL
10x Enhance-Puffer	5 µL
dNTP's (2 mM)	7,5 µL
Magnesiumsulfat	1 µL
DNA-Polymerase Pfx	0,5 µL

Ein typisches Programm hat folgende Reaktionsabfolge:



	<i>Phusion</i> Pol.	<i>Taq/Pwo</i> Pol.-Mix	<i>Platinum</i> <sup>®</sup> <i>Pfx</i> Pol.
T <sub>Polymerase</sub>	72 °C	68 °C	68 °C
t <sub>Polymerase</sub>	30 s für 1000 Basen	40 s für 1000 Basen	1 min für 1000 Basen
T <sub>1</sub> / T <sub>2</sub>	abhängig von den Annealing-Temperaturen der Primer		

**Abb. 3.2-1:** typisches PCR-Programm

Die so erhaltenen Fragmente wurden mit dem „*QIAquickspin PCR purification kit*“ nach Herstellerangaben gereinigt (Abschnitt 3.2.3).

### 3.2.3 Reinigung der PCR-Fragmente

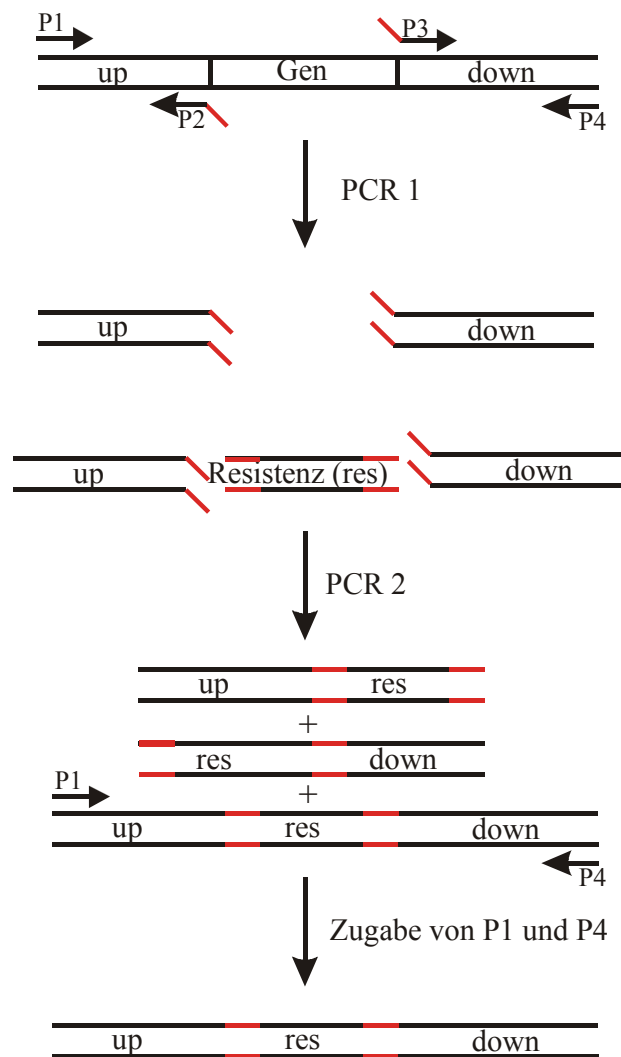
5 Volumen des PB-Puffers wurden zu 1 Volumen PCR-Lösung gegeben. Dieses Gemisch wurde auf eine *QIAquick Spin*-Säule aufgetragen und zentrifugiert (5000 Upm, 2 min, RT). Diese Prozedur wurde noch zwei weitere Male wiederholt und der Durchfluss dann verworfen. Um die DNA zu reinigen, wurden 700 µL PE-Puffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert (13000 Upm, 1 min, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und ein weiteres Mal zentrifugiert (13000 Upm, 2 min, RT). Das im PE-Puffer enthaltene Ethanol wurde bei 80 °C entfernt (2 min). Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und durch Zugabe von 21 µL EB-Puffer eluiert (13000 Upm, 1 min, 80 °C). Dies wurde ein weiteres Mal mit frischem EB-Puffer wiederholt.

### 3.2.4 Herstellung von Gendeletionsmutanten mittels PCR

Diese Methode wurde von Kuwayama *et al.* beschrieben (Kuwayama *et al.*, 2002).

Hierfür wurden zunächst ein *upstream* und ein *downstream* Fragment flankierend zu dem zu eliminierenden Gen mit den Primern P1 und P2 bzw. P3 und P4 (**Abb. 3.2-2**) mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente waren jeweils etwa 1000 bp lang. Da bei der Verwendung des Expand<sup>TM</sup> Long Template PCR-Kit an den Enden überhängende Adenine entstehen, kann es bei der nachfolgenden Fusion der Fragmente zu Problemen kommen. Daher wurden die erhaltenen Fragmente als Template für eine weitere PCR-Reaktion mit der Pfx-Polymerase verwendet, bei der keine überhängenden Enden entstehen. Alternativ hierzu wurde auch direkt im ersten Schritt die Phusion<sup>TM</sup> High-Fidelity DNA Polymerase verwendet, welche *blunt ends* erzeugt und so den zweiten zusätzlichen Schritt einspart.

Die Primer P2 und P3 hatten an ihrem 5'-Ende jeweils eine Sequenz, die zu einer Resistenzkassette komplementär war. In einer weiteren PCR-Reaktion wurden diese drei Fragmente (Resistenzkassette, *upstream*- und *downstream*-Fragment) zusammengegeben. In den ersten 10 Zyklen bildeten sich drei verschiedene Produkte (**Abb. 3.2-2**). Nun wurden erneut die Primer P1 und P4 zugegeben, um nur das Fragment bestehend aus dem *upstream*-Fragment, der Resistenzkassette und dem *downstream*-Fragment zu vervielfältigen.



**Abb. 3.2-2:** Schema zur Herstellung von Deletionsmutanten mittels PCR (Hunger, 2002)

### 3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Trennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Die Visualisierung beruht auf der Interkalierung von Ethidiumbromid (EtBr) zwischen GC-Basenpaare in die doppelsträngige DNA. Dabei bildet Ethidiumbromid einen Komplex, welcher bei einer Bestrahlung mit UV-Licht im sichtbaren Bereich fluoresziert. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (*New England Biolabs*) verwendet (**Abb. 3.2-3**). Für die Herstellung eines Agarosegels wurde 0,8 % (w/v) Agarose zu einer entsprechenden Menge von TB-Gelpuffer (abhängig von der Größe des Gels) gegeben. Das Gemisch wurde in einer Mikrowelle erhitzt bis die Lösung vollkommen klar war. Die Flüssigkeit wurde auf ca. 50 °C abgekühlt, die entsprechende Menge an Ethidiumbromid zugegeben und anschließend in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Erstarren wurde das

Gel mit TB-Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Stärke des angelegten Stroms betrug 100 mA.

#### **10x TB-Laufpuffer**

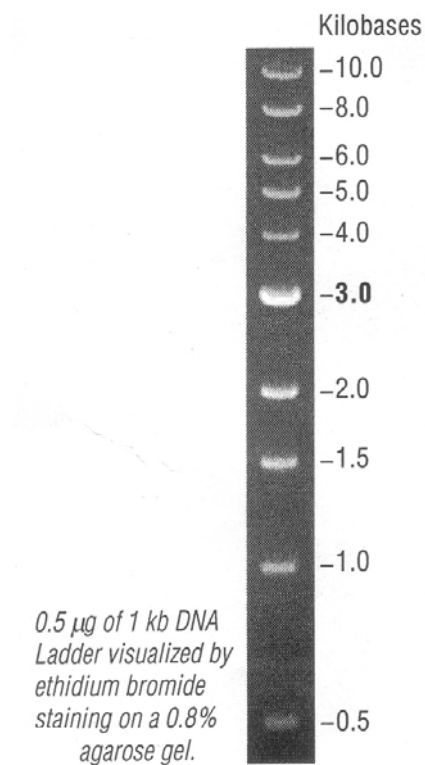
Tris/HCl	109 g/L
B(OH) <sub>3</sub>	55,63 g/L

#### **TB-Gelpuffer / TB-Laufpuffer**

10x TB-Laufpuffer	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	900 mL

#### **6x DNA-Probenpuffer**

Ficoll 400	15 % (w/v)
Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylenxyanol	0,25 % (w/v)



**Abb. 3.2-3:** 1 kb DNA-Leiter

### **3.2.6 Einfache Reinigung von Plasmid-DNA**

Diese Methode ist auch unter dem Begriff „*quick and dirty*“ bekannt. 2 mL einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (13000 Upm, 5 min, RT) und anschließend in 300 µL P1-

Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von je 300  $\mu\text{L}$  P2 und P3 wurde der Ansatz gemischt und danach 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurde das Gemisch zentrifugiert (13000 Upm, 15 min, RT) und der so erhaltene Überstand in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Zur Fällung der DNA wurde der Überstand mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (13000 Upm, 30 min, RT). Das Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in der SpeedVac getrocknet (15 min) und in 40  $\mu\text{L}$  EB-Puffer aufgenommen.

**P1**

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 $\mu\text{g/mL}$

**P2**

NaOH	200 mM
SDS	1 % (v/v)

**P3**

KOAc	2,55 M
------	--------

**EB-Puffer**

Tris/HCl, pH 8,5	10 mM
------------------	-------

### 3.2.7 Hydrolytische Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die hydrolytische Spaltung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese Enzyme erkennen eine palindrome Tetra- oder Hexanukleotidsequenz, innerhalb der sie die DNA hydrolytisch spalten. Dabei entstehen je nach Enzym glatte Enden („*blunt ends*“) oder 3'- bzw. 5' überhängende Enden („*sticky ends*“). Das 5'-Ende trägt nach der Spaltung immer die Phosphatgruppe, das 3'-Ende die freie Hydroxylgruppe.

Der Restriktionsansatz (Verdau) setzte sich je nach gewünschter DNA-Menge nach folgender Regel zusammen: Sie wurden im 10  $\mu\text{L}$ - (analytisch) und im 30  $\mu\text{L}$ -Maßstab (präparativ) durchgeführt. Die zu verdauende DNA wurde mit 10x Reaktionspuffer (1/10 des Gesamtreaktionsvolumens) und 1  $\mu\text{L}$  der Restriktionsendonuklease versetzt. Der Ansatz wurde anschließend auf das Endvolumen mit sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Analytische Verdauungen wurden für 1,5 h und präparative für mindestens 3 h bei 37 °C inkubiert und entweder über eine Säule (Abschnitt 3.2.3) oder ein Agarosegel (Abschnitt 3.2.5) gereinigt.

### 3.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten, in der Regel ein mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 3.2.7) geschnittenes Plasmid und ein ebenso geschnittenes Insert. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und den 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Dabei wurde für einen Ligationsansatz ein Überschuss an Insert im Vergleich zum Plasmid verwendet (mindestens 3:1). Die Konzentration der verwendeten DNA wurde zuvor über Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.5) abgeschätzt. Der Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16 °C oder 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein typischer Ligationsansatz hat folgende Zusammensetzung.

<b>Ligationsansatz</b>	
T4 DNA Ligase	1 µL
10x T4 DNA Ligase-Puffer	1 µL
Plasmid-DNA	1-2 µL
Insert	3-7 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad.10 µL

### 3.2.9 Vorbereitung von CaCl<sub>2</sub> kompetenten *E. coli* Zellen

Bei *E. coli* kann der zeitlich begrenzte Zustand der Kompetenz durch die Behandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid induziert werden (Dagert und Ehrlich, 1979). Zur Herstellung kompetenter *E. coli* BL21 Zellen mit Calciumchlorid wurden 300 mL LB Medium mit einer Vorkultur 1/100 inokuliert und bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6 herangezüchtet (250 Upm, 37 °C). Die Suspension wurde auf sechs 50 mL Greinerröhrchen verteilt, zentrifugiert (4000 Upm, 5 min, 4 °C) und die Zellpellets in eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (jeweils 25 ml) suspendiert und auf Eis gestellt (30 min). Nach erneuter Zentrifugation (4000 Upm, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen vorsichtig mit jeweils 1 mL eiskalter 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und mit 210 µL 86 % Glycerol versetzt (Endkonzentration 15 %). Es wurden 200 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.2.10 Transformation von CaCl<sub>2</sub> kompetenten *E. coli* Zellen

Plasmid-DNA (1-3 µL) wurde mit 200 µL kompetenten Zellen versetzt und auf Eis inkubiert (25 min). Nachfolgend wurde die Suspension einem Hitzeschock ausgesetzt (2 min, 42 °C)

und sofort wieder auf Eis gestellt (30 s). Der Hitzeschock bewirkt die Aufnahme der extrachromosomalen DNA durch die Zellwand. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 1 mL LB-Medium inkubiert (30 min, 37 °C). Die Suspension wurde zentrifugiert (13000 Upm, 1 min), das Pellet mit 100 µL des Überstandes suspendiert und auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Durch Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde auf resistente Zellen selektiert.

### 3.2.11 Vorbereitung von *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Zur Präparation elektrokompetenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB Medium mit 4 mL einer *E. coli* TOP10 Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> 0,5-0,6 inkubiert (250 Upm, 37 °C). Die weitere Aufarbeitung erfolgte auf Eis. Die Kultur wurde in acht 50 mL Greinerröhrchen aufgeteilt und durch Zentrifugation pelletiert (5000 Upm, 10 min, 4 °C). Die Pellets wurden zweimal mit je 40 mL eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und erneut zentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4 °C). Die acht Pellets wurden anschließend in ca. 8 mL eiskaltem dH<sub>2</sub>O vereinigt und in 2 mL Reaktionsgefäßen pelletiert (13000 Upm, 5 min, 4 °C). Die Pellets wurden in insgesamt 800 µL 10 % Glycerin aufgenommen. Die dickflüssige Zellsuspension wurde in 1,5 mL Reaktionsgefäßen à 40 µL aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.12 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

Bei der Elektrotransformation werden die *E. coli* Zellen zwischen den Platten eines Kondensators einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Die DNA dringt dabei durch die Membran in die Zelle. Die sterilen Elektroporationsküvetten wurden auf Eis vorgekühlt und mit einem Aliquot vorbereiteter *E. coli* Zellen (Abschnitt 3.2.11) und 1 µL des Ligationsansatzes (Abschnitt 3.2.8) versetzt. Alternativ wurde der komplette Ligationsansatz von 10 µL verwendet, der dann allerdings vorher 30 min gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert werden musste, um die Probe zu entsalzen. Die Transformationen wurden bei einer Spannung von 2500 V und einer elektrischen Feldstärke von 12,5 kV/cm durchgeführt. Am Elektroporator wurden 200 Ω eingestellt. Nach der Elektroporation wurden das Gemisch in 1 mL vorgewärmten LB-Medium aufgenommen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Durch die Inkubation über Nacht bei 37 °C im Brutschrank wurde auf resistente Zellen selektiert.

### 3.2.13 Herstellung und Transformation kompetenter *B. subtilis* Zellen

Im Gegensatz zu *E. coli* wird *B. subtilis* beim Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase auf natürliche Weise kompetent (Dubnau, 1991). Dies wird bei der Herstellung von kompetenten *B. subtilis* Zellen ausgenutzt. Die doppelsträngige DNA wird an die Zellmembran gebunden und nach Degradierung durch membrangebundene Nukleasen als Einzelstrang in die Zelle aufgenommen.

Gemäß der Zweistufenmethode (Klein *et al.*, 1992) wurde der zu transformierende *B. subtilis* Stamm auf einer DSM-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Mit einer Kolonie von dieser Platte wurde eine 2 mL HS-Vorkultur inokuliert und über Nacht inkubiert (250 Upm, 37 °C). 20 mL vorgewärmtes LS-Medium wurde mit 0,5 mL der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert (100 Upm, 30 °C). Dann wurde 1 mL dieser Kultur in ein steriles 2 mL Reaktionsgefäß überführt, welches die zu transformierende DNA enthielt, und inkubiert (250 Upm, 2 h, 37 °C). Während dieser Zeit waren die Zellen in der Lage, die Fremd-DNA aufzunehmen. Der Transformationsansatz wurde auf DSM-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 10x S-Base

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O	140 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
Natriumzitrat x 3 H <sub>2</sub> O	10 g
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

Nach dem Autoklavieren wurde noch 1 mL 1 M MgSO<sub>4</sub> (steril filtriert) zugesetzt.

#### HS-Medium

10x S-Base	10 mL
Glukose, 50 % (w/v)	1 mL
Hefeextrakt, 10 % (w/v)	1 mL
Caseinhydrolysat, 2 % (w/v)	1 mL
Arginin, 8 % (w/v); Histidin, 0,4 % (w/v)	10 mL
Tryptophan, 0,5 % (w/v)	1 mL
Phenylalanin, 0,3 % (w/v)	1,5 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 100 mL

Die Lösung wurde steril filtriert.



**LS-Medium**

10xS-Base	2 mL
Glukose, 50 % (w/v)	200 µL
Hefeextrakt, 10 % (w/v)	200 µL
Caseinhydrolysat, 2 % (w/v)	100 µL
Spermin, 50 mM	200 µL
Tryptophan, 0,5 % (w/v)	20 µL
Phenylalanin, 0,3 % (w/v)	30 µL
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	50 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 20 mL

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert.

### 3.3 Arbeiten mit RNA

Ein Tropfen RNA-Lösung wird auf der menschlichen Haut in wenigen Sekunden vollständig degradiert. Deshalb müssen für das Arbeiten mit RNA alle Geräte und Lösungen frei von RNasen sein. Das erreicht man durch Erhitzen oder den Einsatz von RNase-Inhibitoren. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und autoklaviert. Die verwendeten Pipetten wurden mit RNAZap (*Ambion Inc.*) besprüht und abgewischt. Leere Glasgefäße können durch Erhitzen von RNasen befreit werden.

**DEPC-Wasser**

DEPC (Diethylpyrophosphat)	1 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1000 mL

Die Lösung wurde über Nacht stehen gelassen und anschließend autoklaviert.

#### 3.3.1 RNA-Präparation

##### 3.3.1.1 Zellkultivierung und Probenentnahme

Die Kulturen für die Präparation von gesamter RNA wurden unter unterschiedlichen Bedingungen herangezogen, um vergleichende Analysen der RNA zu ermöglichen. Für eine Wachstumsbedingung wurden je Stamm zwei bis vier parallele Kulturen unabhängig voneinander gezogen. Dabei war die schnelle Probenentnahme und -aufbereitung wichtig, um den Abbau der RNA zu verhindern.

Für ein Kälteschockexperiment wurde folgende Methode verwendet. Von einer frischen Platte wurden 3 mL SMM-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (220 Upm, 37 °C). Mit der Vorkultur wurden 200 mL vorgewärmtes SMM Medium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 inokuliert und im Wasserschüttler inkubiert (220 Upm, 37 °C). Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,45-0,5 wurden 30 mL Probe entnommen, die 15 OD<sub>600</sub> Zellen entsprechen ( $V[\text{mL}] = 15/\text{OD}_{600}$ ). Die verbliebende Kultur wurde sofort in einen 15 °C kalten Wasserschüttler gestellt und dort weiter inkubiert (220 Upm, 15 °C). Nach 70 min Kälteschock wurden erneut 30 mL Probe entnommen (wieder etwa 15 OD<sub>600</sub> Zellen, da sich die OD<sub>600</sub> bei 15 °C nach 70 min kaum geändert hat). Die entnommenen Proben wurden in Greinerröhrchen pipettiert in denen zuvor 20 mL *Killing-Mix* schräg eingefroren wurde (um ein rasches Abkühlen der Probe zu erreichen) und anschließend zentrifugiert (5000 Upm, 15 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 mL 4 °C kaltem *Killing-Mix* resuspendiert, in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (13000 Upm, 5 min, 4 °C). Dieses wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

#### **Killing-Mix**

Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaN <sub>3</sub>	200 mM

### **3.3.1.2 Zellaufschluss für RNA-Präparation**

Für den Zellaufschluss wurde eine Kugelmühle verwendet, die es ermöglicht mit gefrorenen Proben zu arbeiten. Ein Zellpellet von 15 OD<sub>600</sub> (Abschnitt 3.3.1.1) wurde in 200 µL *Killing-Mix* resuspendiert und in das mit flüssigem Stickstoff gefüllte Probengefäß der Kugelmühle pipettiert. Das Probengefäß wurde verschraubt, an der Kugelmühle befestigt und geschüttelt (2600°Upm, 2 min). Das Zellmehl wurde in 4 mL auf 50 °C vorgewärmten Lyse-Puffer aufgenommen, auf vier 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### **Lyse-Puffer**

Natriumacetat, pH 5,2 (Endkonz. 0,025 M)	2,08 mL
Guanidinthiocyanat (Endkonz. 4 M)	118,16 g
10 % N-Lauroylsarcosinat (Endkonz. 0,5 %)	12,5 mL
DEPC H <sub>2</sub> O	ad. 250 mL

### 3.3.1.3 RNA-Extraktion mit der „Saure Phenol“-Methode

Bei der Behandlung des Zelllysats mit saurem Phenol gelangt die DNA in die organische Phase, die RNA verbleibt in der wässrigen Phase und kann weiter gereinigt werden (Majumdar *et al.*, 1991).

Das noch gefrorene Zelllysat wurde mit einem Volumen (1 mL) saurer Phenol-Lösung versetzt, im Eppendorf-Mixer geschüttelt (750 Upm, 5 min, RT) und zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, RT). Von dem Überstand wurden nur 900 µL abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um Verunreinigungen mit DNA aus der Interphase zu vermeiden. Es wurde erneut mit einem Volumen (900 µL) saurer Phenol-Lösung versetzt und nach Schütteln im Eppendorf-Mixer (750 Upm, 5 min, RT) zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, RT). Von dem Überstand wurden nur 800 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde mit einem Volumen Chloroform/IAA (800 µL) versetzt und nach Schütteln im Eppendorf-Mixer (750 Upm, 5 min, RT) zentrifugiert (12000 Upm, 5 min, RT). Schließlich wurde dieser Überstand (ca. 800 µL) in ein neues Reaktionsgefäß überführt, nacheinander mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 (80 µL) und 1 mL Isopropanol vermischt und die RNA über Nacht bei –20 °C präzipitiert.

Die RNA wurde zentrifugiert (13000 Upm, 15 min, 4 °C) der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70 % Ethanol (1 mL) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet entweder in der SpeedVac (1 min!) oder an der Luft getrocknet (15 min, 37 °C). Schließlich wurde die RNA in DEPC H<sub>2</sub>O gelöst.

#### **Saure Phenol-Lösung**

Aqua-Phenol ( <i>Roth</i> )	50 mL
Chloroform	48 mL
Isoamylalkohol	2 mL

Die Lösung wurde zweimal mit sterilem DEPC-Wasser ausgeschüttelt.

#### **Chloroform/IAA**

Chloroform	96 mL
Isoamylalkohol	4 mL

Die Lösung wurde mit Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert.

### 3.3.1.4 Reinigung gesamter RNA

Mittels des *Qiagen* RNeasy Mini Kits konnte gesamte RNA in der Größenordnung von 100 µg über Silicagelsäulen gereinigt werden. Die 100 µg RNA werden in 100 µL DEPC Wasser mit 350 µL RLT Puffer (+10 µL β-Mercaptoethanol pro 1 mL RLT) vermischt. Zu der verdünnten RNA wurden 250 µL 96-100 % Ethanol gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt. Die Probe wurde umgehend (ca. 700 µL) auf eine RNeasy Mini Säule mit 2 mL Reaktionsgefäß aufgetragen und zentrifugiert (13000 Upm, 20 s, RT). Die Säule wurde in einem neuen 2 mL Reaktionsgefäß platziert und mit 500 µL RPE Puffer durch Zentrifugation gewaschen (13000 Upm, 20 s, RT). Der Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und anschließend die Säule wieder in ein neues 2 mL Reaktionsgefäß platziert und zur Trocknung der Silicagelmembran noch einmal zentrifugiert (13000 Upm, 1 min, RT). Die RNA wurde mit 30-35 µL DEPC H<sub>2</sub>O für 3 min inkubiert und anschließend in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß eluiert (13000 Upm, 1 min, RT). Zur Erhöhung der Ausbeute wurde das Eluat ein weiteres Mal auf die Säule gegeben und zentrifugiert.

### 3.3.1.5 Reinheitskontrolle gesamter RNA

Die Reinheit der gereinigten gesamtrNA wurde mittels des RNA 6000 Nano Series II Kits und des 2100 Bioanalyzer der Firma *Agilent Technologies* (Abschnitt 2.1 und 2.2) nach Vorschrift des Herstellers überprüft. Hierbei handelt es sich um eine Trennung der RNA durch Kapillarelektrophorese.

### 3.3.2 Northernblotanalyse

Der Northernblot dient zur Transkriptionsanalyse eines Gens. Dabei wird die Größe und Menge einer spezifischen mRNA-Menge unter bestimmten Kultivierungsbedingungen ermittelt (Serrano *et al.*, 2001). Die zuvor präparierte mRNA (Abschnitt 3.3.1.3) wird denaturiert, über ein Gel getrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und über eine genspezifische digoxigeninmarkierte RNA-Sonde detektiert.

### 3.3.2.1 Erstellen einer digoxigeninmarkierten RNA-Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurde ein etwa 600 bp langes internes PCR Fragment des zu untersuchenden Gens amplifiziert, wobei der 3'-Primer zusätzlich die Sequenz des T7 RNA Polymerase Promotors enthielt. Ausgehend von dem Amplifikat mit T7 Promotor wurde durch *run-off* Transkription mit dem T7-RNA-Polymerase Kit (*Ambion Inc.*) die *antisense* orientierte RNA erstellt. Die eingesetzten Nukleotide waren mit Digoxigenin gekoppelt, um die spätere Detektion der Sonde zu ermöglichen.

### 3.3.2.2 Gießen von Agarosegelen zur RNA-Trennung

Die zu untersuchende mRNA wurde zunächst durch Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Das Agarosegel wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und 1 h abkühlen gelassen. Das Formaldehyd im Gel verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen der mRNA.

#### **Agarose-Gel für RNA**

Agarose	6 g
DEPC H <sub>2</sub> O (autoklaviert)	292 mL
10x MOPS-Puffer	40 mL

Nach Durchmischen, Aufkochen und Abkühlen auf 60 °C wurden 68 mL 35 % Formaldehyd dazugegeben.

#### **10x MOPS-Puffer (DEPC H<sub>2</sub>O)**

MOPS/NaOH, pH 7,0	0,2 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

### 3.3.2.3 Probenvorbereitung von RNA für Agarosegele

Während sich das Agarosegel verfestigte, wurden die RNA-Proben mit Probenpuffer (1 Volumen) versetzt, denaturiert (10 min, 68 °C), auf Eis abgeschreckt und sofort auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 120 V etwa 3-3,5 h.

**Probenpuffer**

Formamid	6,5 mL
Formaldehyd	1,2 mL
10x MOPS-Puffer	2 mL
50 % Sucrose	0,4 mL
Bromphenolblau	20 mg
Xylenyanol	20 mg

**3.3.2.4 Aufbereitung von RNA-Agarosegelen**

Während das Agarosegel lief, wurde die Blotapparatur mit der Nylonmembran aufgebaut. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel auf die Blotapparatur gelegt und für 5 min mit 50 mM NaOH zur partiellen Hydrolyse der RNA übergossen. Die Natronlauge wurde abgesaugt und das Gel für 5 min mit 10 mM NaCl-Lösung übergossen. Das Gel wurde anschließend mit 20x SSC Puffer übergossen und 1,5-2 h mittels Vakuum auf die Membran aufgebracht („geblottet“). Anschließend wurden auf der Membran die Taschen des Gels mit Kugelschreiber markiert und die RNA durch zweimaliges UV-*crosslinking* (“StrataLinker”, *Stratagene*) auf der Membran fixiert.

**20xSSC Puffer**

Na-Zitrat/HCl, pH 7,0	88,2 g
NaCl	175,3 g
DEPC H <sub>2</sub> O	ad. 1000 mL

**3.3.2.5 Dot-Blot**

Alternativ zu der Vorgehensweise aus Abschnitt 3.3.2.4 konnte auch der sogenannte “Dot-Blot” verwendet werden. Hierbei entfällt die Trennung über ein Gel. Die RNA-Proben wurden direkt auf die Nylonmembran durch eine 96er-Wellplateapparatur aufgebracht. Die Membran wurde in die Apparatur eingespannt und mittels Vakuum wurden die Proben von oben auf die Membran aufgebracht. Anschließend wurde wie oben beschrieben die RNA durch zweimaliges UV-*crosslinking* auf der Membran fixiert.

**3.3.2.6 RNA-Hybridisierung und Waschen**

Die Membran wurde in verschraubten Glasröhren mit Hybridisierungslösung prähybridisiert (1 h, 68 °C). Am Ende dieser Stunde wurde die Sonde denaturiert (10 min, 95 °C), die Hybridisierungslösung abgegossen und die Sonde in 20 mL frischer Hybridisierungslösung auf

die Membran gegossen und über Nacht geschwenkt (68 °C). Die Lösung wurde abgegossen und die Sonde konnte bei -20 °C bis zur Wiederverwendung gelagert werden. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Protokoll gewaschen:

#### **Waschen**

2x SSC; 0,1% SDS	50-100 mL	5 min
2x SSC; 0,1% SDS	50-100 mL	5 min
0,2x SSC; 0,1% SDS	50-100 mL	15 min
0,2x SSC; 0,1% SDS	50-100 mL	15 min
Puffer 1	50-100 mL	1 min
Puffer 2	50 mL	30 min
Puffer 2 mit 4 µL Antikörper-Konjugat (1:10000 Verdünnung)	40 mL	30 min
Puffer 1	50-100 mL	15 min
Puffer 1	50-100 mL	15 min

#### **Hybridisierungslösung**

Formamid	100 mL
20x SSC	50 mL
<i>Blocking reagent</i> (bei 50°C lösen)	4 g
10% N-Lauroylsarkosin	2 mL
SDS	14 g
DEPC H <sub>2</sub> O	ad. 200 mL

Die Lösung wurde nicht autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

#### **Puffer 1**

Maleinsäure/NaOH (fest), pH 7,5	116,1 g
NaCl	87,66 g
DEPC H <sub>2</sub> O	ad. 1000 mL

Die Lösung wird erst bei pH 7 klar.

#### **Puffer 2**

Puffer 1	450 mL
10% <i>Blocking reagent</i>	50 mL

#### ***Blocking reagent***

<i>Blocking reagent</i>	10 g
Puffer 2	ad. 100 mL

Die Lösung wurde bei 50 °C eine Stunde gerührt und danach autoklaviert. Die Lösung wird nicht klar.

### 3.3.2.7 Detektion

Die Membran wurde nach dem Waschen kurz in 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 geschwenkt und abtropfen gelassen. Auf die Glasplatte des Phosphoimagers (Storm860, *Amersham-Pharmacia*) wurde das Substrat pipettiert, mit der Membran belegt und mit Folie abgedeckt. Die Umsetzung des Substrates durch den an die RNA gebundenen, mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper führt zu einem fluoreszierenden Produkt, welches durch den Laser des Phosphoimagers angeregt wird. Das emittierte Licht wurde gemessen und mit dem Programm Image Quant (*Molecular Dynamics*) quantifiziert.

## 3.3.3 Transkriptionsanalyse von *Bacillus subtilis*

Die Transkriptionsanalyse von *B. subtilis* mit Mikroarrays ist eine vergleichende Methode. Dabei wird die Menge der jeweils vorhandenen mRNA-Moleküle aus zwei unterschiedlichen Zellkulturen miteinander verglichen. Dazu wurde erst die gesamte RNA aus den zwei zu vergleichenden Proben isoliert (Abschnitt 3.3.3.1). Diese wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und fluoreszenzmarkiert. Die markierte cDNA wird mit 4096 spezifischen Oligonukleotidprimern, die komplementär zu den 3'Enden der mRNA von *B. subtilis* sind, hybridisiert. Die Signale auf den Arrays wurden anschließend mit einem Scanner detektiert und die Daten mit entsprechender Software am Rechner ausgewertet. Aus den Daten erhält man die relative Transkription der 4096 *orf's* in den zu vergleichenden Zellkulturen.

### 3.3.3.1 Isolation der gesamten RNA aus *Bacillus subtilis*

Die Isolation der RNA aus *B. subtilis* wurde wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.3.3.2 Reverse Transkription und Markierung

Bei der Reversen Transkription wird die aus *B. subtilis* isolierte mRNA (Abschnitt 3.3.3.1) in cDNA umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe der SuperscriptII Polymerase und einem Oligonukleotidprimergemisch (*Invitrogen*). Die 4096 spezifischen Primer sind komplementär zu den 3'Enden der mRNA von *B. subtilis*. Für die spätere Detektion ist ein Teil des für die Synthese der cDNA eingesetzten dUTP's mit Cy3- und Cy5-Fluoreszenzfarbstoffe markiert.



Jede Probe wird für den späteren Vergleich entweder mit Cy3- oder Cy5-Farbstoff markiert sein. Es wurde nach dem folgenden Protokoll vorgegangen.

#### **Reverse Transkription**

RNA (in 15 µL)	25 µg
spezifischer Primer Mix	1 µL
<i>Arabidopsis thaliana</i> mRNA (Kontrolle)	1 µL

Die Reaktion wurde gemischt und inkubiert (10 min, 65 °C). Nach kurzer Zentrifugation wurde erneut inkubiert (10 min, RT) und

5x SuperScript Puffer	10 µL
dNTP Mix (5 mM → 2mM dTTP)	4 µL
DTT	1 µL
Cy3- oder Cy5-dUTP (1 mM)	4 µL
SuperScript II Polymerase	1 µL

zugegeben. Die Reaktion wurde vorsichtig gemischt und im Dunkeln inkubiert (2 h, 42 °C). Danach wurde

NaOH (1 M)	10 µL
------------	-------

zugegeben. Die Reaktion wurde gemischt und weiterhin im Dunkeln inkubiert (10 min, 65 °C). Danach wurde

HCl (1 M)	10 µL
-----------	-------

zugegeben. Die markierte cDNA wurde in 200 µL TE Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

#### **3.3.3.3 Reinigung der cDNA**

Zur Reinigung wurde die aufgenommene cDNA auf CyScribe GFX Säulen (*Invitrogen*) mit vorgelegten 500 µL *capture* Puffer gegeben, durch fünfmaliges Pipettieren vermischt und zentrifugiert (13000 Upm, 30 s, RT). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 600 µL Waschpuffer gewaschen (13000 Upm, 30 s, RT). Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt und jeweils der Durchfluss verworfen. Es wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, um die Säule zu trocknen. Die CyScribe GFX Säule wurde in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß platziert und mit 60 µL Elutionspuffer (65 °C) inkubiert (5 min) und zentrifugiert (13000 Upm, 1 min).

### 3.3.3.4 Prähybridisierung der Mikroarrays

Vor der Hybridisierung wurden die Mikroarrays mit Prähybridisierungslösung prähybridisiert (45 min, 42 °C) und anschließend sechsmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Getrocknet wurden die Arrays in Greinerröhrchen durch Zentrifugation (1500 Upm, 5 min, RT).

<b>Prähybridisierungslösung</b>	
ddH <sub>2</sub> O	150 mL
20x SSC	40 mL
10 % SDS	10 mL
BSA	2 g

### 3.3.3.5 Hybridisierung der cDNA

Die zu vergleichenden Proben (Cy3/Cy5) wurden vereinigt, in der SpeedVak eingeeengt (50 min, 30 °C) und in 50 µL Hybridisierungspuffer aufgenommen.

Für die Hybridisierung der markierten cDNA mit den Mikroarrays (*Eurogentec*) wurde die cDNA denaturiert (2 min, 95 °C) und unter einem *cover slip* in dem Slide Booster (Puls 3:7, Mix Power 27) hybridisiert (16 h, 42 °C).

### 3.3.3.6 Waschen der Mikroarrays

Die *cover slips* wurden entfernt und die Unterseite der Arrays mit 70 % Ethanol abgewischt. Die Arrays wurden zuerst in Waschpuffer I und dann in Waschpuffer II gewaschen (5 min, RT). Getrocknet wurden die Arrays in Greinerröhrchen durch Zentrifugation (1500 Upm, 5 min, RT). Es wurde ein weiteres Mal mit Waschpuffer II gewaschen (5 min, RT) und wieder durch Zentrifugation getrocknet (1500 Upm, 5 min, RT).

### 3.3.3.7 Detektion der Mikroarraysignale

Für die Detektion wurden die getrockneten Arrays in dem ScanArray Express Microarray Scanner (*PerkinElmer*) eingescannt. Hierbei werden die in die RNA eingebauten Fluoreszenzfarbstoffe in ihrem entsprechenden Absorptionsmaximum angeregt (Cy3 - 633 nm / Cy5 - 543 nm).

### 3.3.3.8 Auswertung der Mikroarraydaten

Die eingescannten Daten (Abschnitt 3.3.3.5) wurden mit der ScanArray Express Software (*PerkinElmer*) erfasst, normiert und quantifiziert. Abweichungen zwischen den parallelen Experimenten wurden manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert, wenn die Ursache für die Abweichung z.B. Luftblasen bei der Hybridisierung waren, die als solche auf dem Abbild der Arrays zu erkennen sind. Die Analyse der Daten wurde mit der Software *Gene-Spring* (Version 7.3, *Agilent Silicon Genetics*) vorgenommen. Unter Berücksichtigung aller parallelen Experimente wurden mit *Gene-Spring* die relativen Transkriptionsraten bzw. mRNA-Mengen bestimmt. Dabei wurde nach dem Vergleich unabhängiger Proben gleicher Kultivierungsbedingungen angenommen, dass zweifach höhere bzw. niedrigere mRNA-Mengen als signifikante Änderung gelten.

## 3.4 Proteinchemischer Teil

### 3.4.1 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

Nach Klonierung des Zielgens in einen geeigneten Expressionsvektor (Abschnitt 2.3) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors erfolgte die Produktion des Proteins in *E. coli*. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.1.4) nachgewiesen. Die Reinigung der His<sub>6</sub>-tag Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarosesäulen (Abschnitt 3.4.1.3).

#### 3.4.1.1 Genexpression im pNKH1-Vektor

Der pNKH1 Vektor (Abschnitt 2.3.3) ermöglicht die Überproduktion von Fusionsproteinen mit C-terminalem His<sub>6</sub>-tag für die Proteinreinigung unter Kontrolle des *ara*-Promotors. Zur Expression wurde der *E. coli* Stamm BL21 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert.

Für die Proteinproduktion wurden 300 mL vorgewärmtes LB Medium mit 1/100 (v/v) einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttler inkubiert (250 Upm, 25 °C). Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7-0,8 wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,002 % (w/v) Arabinose induziert und für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (5000 Upm, 15 min, 4 °C).

### 3.4.1.2 Zellaufschluss mit dem Fluidizer

Die mit Aufschlusspuffer (5 mL/500 mL Kultur) resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe eines Fluidizers (*Avestin*) aufgeschlossen. Hierbei werden die Zellen zunächst einem sehr hohen Druck ausgesetzt, der nach Durchfließen einer kleinen Öffnung schlagartig nachlässt. Durch die resultierenden Scherkräfte werden die Zellwände zerrissen und der Zellinhalt freigesetzt. Um die Proteine zu schonen, wurde die gesamte Behandlung bei 4 °C durchgeführt. Nach dem Aufschluss wurde die erhaltene Suspension durch Zentrifugation (17000 Upm, 30 min, 4 °C) von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen getrennt und der klare gelbliche Überstand sofort weiter gereinigt (Abschnitt 3.4.1.3).

#### **Aufschlusspuffer (Hepes)**

Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM

#### **Aufschlusspuffer (Phosphat)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0	50 mM
KCl	300 mM

### 3.4.1.3 Affinitätschromatographie von His<sub>6</sub>-tag Proteinen

IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography) wurde erstmals 1975 für die Proteinreinigung beschrieben (Porath *et al.*, 1975). NTA-Liganden binden als vierzählige Chelate Ni<sup>2+</sup>-Ionen fest an die Gelmatrix. Die beiden freien Koordinationsstellen des Nickels können von den Histidinen des His<sub>6</sub>-tag besetzt werden und ermöglichen so eine spezifische Bindung des rekombinanten Proteins an die Gelmatrix. Die Elution des Proteins erfolgt durch Protonierung der Histidine bei einer pH-Wert Senkung auf 5 oder durch kompetitives Verdrängen der Histidine mit Imidazol. Geringe Imidazolkonzentrationen im Auftragspuffer verringern eine unspezifische Bindung von Proteinen.

Zur Reinigung der His<sub>6</sub>-tag Proteine wurde das FPLC System *Äkta prime* (Amersham/Pharmacia) mit einer HR5/10 Säule (Pharmacia) mit Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (etwa 1 mL) verwendet. Nach Äquilibrieren mit Proteinpuffer wurde die Säule mit dem Zellrohextrakt (Abschnitt 3.4.1.2) mit einer Flussrate von 1 mL/min beladen und mit gleicher Flussrate gewaschen. Proteine wurden durch Messung der UV-Absorption bei 280 nm detektiert. Nachdem der Großteil der zellulären Proteine die Gelmatrix passiert hatte, wurden spezifisch gebundene Proteine durch einen linear steigenden Imidazolgradienten eluiert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE

(Abschnitt 3.4.1.4) untersucht und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (Abschnitt 3.4.2.5) quantifiziert.

**Proteinpuffer (Hepes)**

Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM

**Elutionspuffer (Hepes)**

Hepes/KOH, pH 8,0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM

**Proteinpuffer (Phosphat)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0	50 mM
KCl	300 mM

**Elutionspuffer (Phosphat)**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0	50 mM
KCl	300 mM
Imidazol	250 mM

**3.4.1.4 SDS-PAGE**

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli diente zur qualitativen Proteinanalyse und zur Reinheitskontrolle der gereinigten Proteine (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode lagern sich stöchiometrisch zwei SDS-Moleküle pro Aminosäure eines Proteins an. Durch die Anlagerung werden die Proteine denaturiert und in eine negativ geladene SDS-Micelle eingebettet. Das Maskieren der Proteineigenladung durch die negative Gesamtladung der SDS-Moleküle und die Proportionalität zwischen Proteinkettenlänge und Ladung ermöglicht eine effektive Auftrennung eines Proteingemisches durch Wanderung der negativ geladenen Proteine zur Anode. Das Sammelgel besaß einen pH-Wert von 6,8 und das Trenngel pH 8,8. Zum Gießen der Gele fanden die angegebenen Lösungen Verwendung, die Zusammensetzung variierte allerdings je nach gewünschtem Vernetzungsgrad der Gele. Angegeben ist die Zusammensetzung für ein 5% Sammel- und ein 10% Trenngel. Diese Kombination ist zur Auftrennung von Proteinen der Größen 50 kDa bis 120 kDa geeignet und konnte somit für den überwiegenden Teil der hergestellten Proteine benutzt werden. Als Elektrophoresekammern wurde das *BioRad* Mini-Protean 3 Electrophoresis System benutzt. Die zur Elektrophorese verwendeten Stromstärken lagen bei 10 mA/Gel (Auftragen), 20 mA/Gel (Sammelgel) und 40 mA/Gel (Trenngel). Um im Proteingel den beobachteten

Banden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde stets ein Größenstandard mit aufgetragen. Hierfür wurde der PageRuler Protein Marker (*Fermentas*) verwendet, der 14 Banden von 10-200 kDa zeigt.

**Acrylamidlösung**

Acrylamid	30 % (w/v)
N-N'-Methylenbisacrylamid	0,8 % (w/v)

Angaben für zwei Polyacrylamidgele:

**Sammelgel (5 %)**

Tris/HCl, pH 6,8 (1,5 M)	1,25 mL
Acrylamid-Lösung	0,83 mL
10 % SDS	100 µL
ddH <sub>2</sub> O	2,84 mL
TMEDA	10 µL
10 % APS	50 µL

**Trenngel (10 %)**

Tris/HCl, pH 8,8 (1,5 M)	2,5 mL
Acrylamid-Lösung	3,33 mL
10 % SDS	100 µL
ddH <sub>2</sub> O	4 mL
TMEDA	10 µL
10 % APS	50 µL

**SDS-Laufpuffer**

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	7 mM

**3.4.1.5 Probenvorbereitung für SDS-PAGE**

Zellpellets aus 1 mL Kulturlösung wurden in EB-Puffer (75 µL) und 4x Probenpuffer (25 µL) resuspendiert und erhitzt (10 min, 95 °C), was zur Lyse der Zellen und zur Denaturierung der freigesetzten Proteine führte. Bei Proteinlösungen wurden 3 Teile Probenlösung mit einem Teil 4x Probenpuffer versetzt und ebenfalls erhitzt (10 min, 95 °C). Im Probenpuffer enthaltenes β-Mercaptoethanol führte zur Spaltung aller Disulfidbrücken zwischen Cysteinen. Anschließend wurde zentrifugiert (13000 Upm, 5 min). Die Menge der auf das SDS-Gel aufzutragenden Proben wurde nach dem OD<sub>600</sub>-Wert der Zellkulturen zum Zeitpunkt der

Probenentnahme berechnet (von 1 mL Probe der  $OD_{600} = 1$  wurden 10  $\mu$ L des resuspendierten Pellets aufgetragen).

#### **4x Probenpuffer**

Tris/HCl, pH 6,8	50 mM
SDS	8 % /w/v)
Glycerin	40 % (v/v)
$\beta$ -Mercaptoethanol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	5 mg/L

#### **3.4.1.6 Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen**

Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit der Coomassie-Färbemethode sichtbar gemacht (Bennett und Scott, 1971). Dazu wurde Coomassie Brilliant Blue R-250 als Farbstoff benutzt. Das Gel wurde in der Färbelösung 30 s gekocht und noch 10 min geschüttelt. Durch wiederholten Austausch gegen neue Entfärber-Lösung und Wasser wurde das Gel entfärbt, bis die Proteine sichtbar wurden.

#### **Färbelösung**

Ethanol	500 mL
Essigsäure	100 mL
Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

#### **Entfärber-Lösung**

Ethanol	200 mL
Essigsäure	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

#### **3.4.2 Proteom-Analyse mittels 2D-Gelelektrophorese**

Unter zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) versteht man ganz die Kombination zweier beliebiger elektrophoretischer Trennmethode. Um eine möglichst effiziente Auflösung zu erzielen, ist es erforderlich, die Parameter, nach denen in beiden Dimensionen die elektrophoretische Auftrennung erfolgt, geschickt zu wählen. Inzwischen hat sich dabei besonders die 1975 erstmals von O'Farrell (O'Farrell, 1975) eingeführte Nacheinanderschaltung von denaturierender Isoelektrischer Fokussierung, IEF und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE, bewährt.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Zellaufzucht und Probenentnahme, der Zellaufschluss und die Ankonzentration der Proteine, sowie die Probenvorbereitung beschrieben. Bis es schließlich um die Fokussierung nach pI in der ersten Dimension und die Auftrennung nach Größe in der zweiten Dimension geht.

### 3.4.2.1 Zellaufzucht und Probenentnahme

Die Zellaufzucht und Entnahme der Proben hing von der jeweilig angewendeten Methode ab, mit der die Proteine sichtbar gemacht werden sollten. In dieser Arbeit wurden sowohl coomassiegefärbte als auch mit radioaktivem Schwefel ( $^{35}\text{S}$ ) markierte Gele verwendet.

#### Coomassie-Gele

Für die 2D-PAGE wurde für den zu untersuchenden *B. subtilis* Stamm eine 200 mL Kultur angezogen. Die 200 mL des vorgewärmten SMM-Minimalmediums wurden mit der entsprechenden Menge einer Übernachtskultur auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,05 angeimpft und bis zur gewünschten  $\text{OD}_{600}$  wachsen gelassen ( $\text{OD}_{600} = 0,45\text{-}0,55$ ).

Die Kulturen wurden je nach experimentellen Anforderungen verschieden inkubiert und anschließend auf vier 50 mL Greinerröhrchen verteilt und dann zentrifugiert (5000 Upm, 10 min, 4 °C). In diesem Fall wurden die Zellkulturen der 37 °C-Proben sofort und die der 15 °C-Proben erst nach 70 minütigem Kälteschock verwandt.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellpellets einer Probe nacheinander in insgesamt 1 mL auf Eis vorgekühltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert und in 1,5 mL Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach erneuter Zentrifugation (13000 Upm, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand abgezogen und verworfen. Die so erhaltenen Zellpellets wurden - nach erneutem Waschen mit kaltem ddH<sub>2</sub>O - in flüssigen Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### $^{35}\text{S}$ -gelabelte Gele

Für die radioaktiv markierten Gele wurden 30 mL steriles SMM-Medium mit den entsprechenden Zusätzen versetzt und mit den Übernachtskulturen der zu untersuchenden *B. subtilis* Stämme auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,05 angeimpft. Die Kulturen wurden in den 50 mL Erlenmeyerkolben schüttelnd bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,45\text{-}0,5$  wachsen gelassen. Es wurden nun pro Stamm jeweils zweimal 4 mL Kultur entnommen und auf vortemperierte 10 mL Erlenmeyerkolben verteilt. So wurden je eine 4 mL-37 °C-Probe und



eine 4 mL-15 °C-Probe erhalten. Die 37 °C-Proben wurden sofort mit der entsprechenden Menge (60 µCi pro Probe) an radioaktivem Methionin für 10 min inkubiert (0-10 min), während die 15 °C-Proben sofort einem 15 °C-Stress ausgesetzt und erst nach 30 min für 60 min mit <sup>35</sup>S-Methionin inkubiert wurden (30-90 min).

Nach 10 min bzw. 60 min Inkubation wurden die 4 mL-Zellproben in 2 mL-Portionen aufgeteilt und zu jeweils 200 µL STOP-Lösung, die Chloramphenicol zur Translationsinhibition enthält, gegeben. Des Weiteren gewährleistete zusätzlich ein Überschuss an nicht radioaktivem Methionin, dass ab diesem Zeitpunkt keine neuen markierten Proteine mehr synthetisiert wurden und eine „Momentaufnahme“ der Zellsynthese festgehalten werden konnte.

Nach 5 min Inkubation auf Eis und Zentrifugation (13000 Upm, 3 min, 4 °C) wurden die erhaltenen Zellpellets (2 Pellets pro Probe) vom Überstand befreit und in insgesamt 400 µL WASCH-Lösung resuspendiert und in einem frischen Reaktionsgefäß vereint. Nach erneuter Zentrifugation (13000 Upm, 3 min, 4 °C) wurde der Überstand entfernt und die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

#### **STOP-Lösung**

Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
Chloramphenicol	1 mg/mL
Methionin (10 mM)	10 mM

Die Lösung wurde steril filtriert und in 200 µL Aliquots in 2 mL Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

#### **WASCH-Lösung**

Tris/HCl, pH 7,5	100 mM
Chloramphenicol	1 mg/mL

Die Lösung wurde steril filtriert und in 800 µL Aliquots in 1 mL-Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert.

### **3.4.2.2 Aufschluss der Zellen**

Zum Zellaufschluss wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut, weiterhin auf Eis gekühlt und mit 800 µL Resuspensionspuffer versetzt. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Sonde wurde 5x für 30 s, bei einer gerätespezifischen Maximaleinstellung von 25-30 %

Leistung des Spannungsgerätes, und einem Arbeitsintervall von 80 % eingestellt. Zwischen den 30 s Beschallung wurde jeweils 30 s auf Eis pausiert, um die Lösung abzukühlen.

Das Zelllysats wurde zweimal zentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4 °C) und der Überstand abgezogen.

#### **Resuspensionspuffer**

Tris/HCl, pH 7,4	10 mM
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1 mg/mL
RNase A (100 U/mg)	100 µg/mL
DNase 1 (100 U/mg)	100 µg/mL
PMSF (in 200 µL EtOH)	24,3 mg

### **3.4.2.3 Gefriertrocknung der Gesamtproteinextrakte**

Die Proteinextrakte wurden in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Vakuum von ca. 20 Torr über Nacht lyophilisiert bis die Proteine vollständig trocken waren. Das Lyophilisat wurde anschließend bei -20 °C gelagert.

### **3.4.2.4 Probenvorbereitung**

Für die nun nachfolgenden Schritte ist es wichtig zu wissen wie viel Protein in den Proben enthalten war bzw. wie viel Radioaktivität. Die Bestimmung ist von der jeweiligen Methode, die gewählt wurde, abhängig (Coomassie/<sup>35</sup>S-markierte Gele). Für Coomassie-Gele wurde eine definierte Proteinmenge benötigt. Der Gesamtproteingehalt für coomassiegefärbte Gele betrug in einem Bereich von drei pH-Einheiten (z.B. 4-7) zwischen 400-1200 µg und in einem Bereich von einer pH-Einheit (z.B. 4-5) 2000 µg. Für die <sup>35</sup>S-markierten Gele wurde eine Menge von 600000 cpm pro Gel verwendet.

### **3.4.2.5 Bestimmung der aufzutragenden Menge auf den IPG-Strip**

#### **Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Anfärben mit Coomassie Blue G-250 nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Durch die Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Die resultierende Absorption bei 595 nm ist hierbei der Proteinkonzentration direkt proportional. Die Absorption wurde mittels des Viktor V2 Microplate Analyzers (Perkin Elmer) ermittelt. Für die Bestimmung nach Bradford wurden

zunächst die lyophilisierten Proben in der minimalen Menge an Rehydratisierungspuffer (üblicherweise 500 µL) aufgenommen. Von den Proben wurden dann je drei Verdünnungen angesetzt (1:10, 1:100, 1:1000). Diese Verdünnungen wurden zusammen mit BSA-Standards (10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL BSA) und einer Referenz (10 µL Rehydratisierungspuffer) auf eine 96-Well-Plate pipettiert. Im Microplate Analyzer wurden die Verdünnungen mit je 100 µL Bradford-Lösung versetzt und die Absorption jedes Wells gemessen.

#### **Bradford-Lösung**

95 % Ethanol	50 mL
85 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	100 mL
Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad. 1 L

#### **Bestimmung der Menge an Radioaktivität**

Für die Ermittlung der Menge an Radioaktivität in einer Probe wurden je 5 µL nicht lyophilisierte Probe auf ein kleines Stück Whatmanpapier pipettiert und in ein 25 mL Greinerröhrchen gegeben. Zunächst wurde für 10 min mit eiskalter 10 % Trichloressigsäure (TCA) gewaschen, nachfolgend für weitere 10 min mit eiskalter 5 % TCA-Lösung und abschließend zweimal für 10 min mit 100 % Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen. Die Filterpapiere wurden getrocknet und mit 3 mL Scintillationsflüssigkeit in ein Scintillationsgefäß gegeben, welches in einem Scintillationszähler analysiert wurde.

#### **3.4.2.6 Resolubilisierung der lyophilisierten Proteinextrakte**

Für die nachfolgende Rehydratisierung der IPG-Streifen mit der Proteinlösung und die Isoelektrische Fokussierung wurden die erforderlichen Mengen für Coomassie- und <sup>35</sup>S-markierte Gele entnommen und mit Rehydratisierungspuffer aufgenommen. Die Gesamtmenge zur Rehydratisierung betrug 420 µL.

#### **3.4.2.7 Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung, IEF mit der Multiphor II**

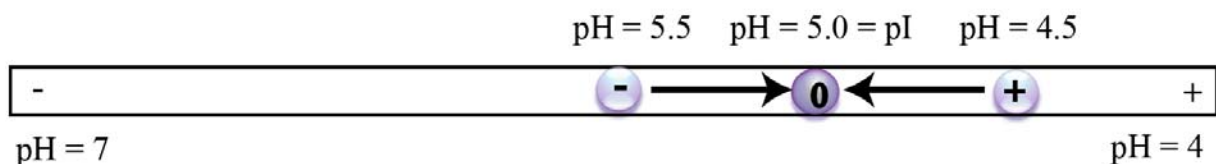
Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Trennung von Proteinen gemäß ihres isoelektrischen Punktes. Dieser ist als genau der pH-Wert definiert, bei dem das Protein als amphotere Substanz keine Nettoladung mehr trägt. Zur Durchführung dieser Trennmethode lässt man die Proteine innerhalb eines elektrischen Feldes ein Gel durchlaufen, welches einen

pH-Gradienten besitzt. Je größer die Trennstrecke, also die Gellänge ist, desto schärfer wird die Auflösung.

Zur Isoelektrischen Fokussierung wurde die Multiphor II von *Pharmacia* in Kombination mit dem PowerPac 3000 Spannungsgenerator der Firma *BioRad* benutzt, mit der man vorgefertigte IEF-Gele mit einem immobilisierten pH-Gradienten verwenden kann.

Diese Fokussierungsstreifen bestehen aus einem Polyacrylamid-Gel, welches auf eine PVC-Membran aufgebracht ist und in das geladene Seitenketten eingebracht sind. Sie werden so hergestellt, dass aus einem sauren und einem basischen Acrylamid-Puffer, analog der Herstellung eines Gradientengels, ein Gemisch gegossen wird, dass den pH-Bereich (z.B. pH 4-7) und die Form (linear/nicht linear) des pH-Gradienten bestimmt.

Das Prinzip der Isoelektrischen Fokussierung wird nachfolgender **Abb. 3.4-1** exemplarisch erläutert:



**Abb. 3.4-1:** Prinzip der Isoelektrischen Fokussierung

### 3.4.2.8 Rehydratisierung und Fokussierung

Die lyophilisierten Proben wurden in 500 µL Rehydratisierungspuffer aufgenommen und dann soviel Lösung entnommen, dass diese 600000 cpm enthielten. Nachdem die Lösung auf 420 µL aufgefüllt wurde, konnte diese für die nachfolgende Rehydratisierung verwendet werden.

#### **Rehydratisierungspuffer**

Harnstoff	2,4 g
Thioharnstoff	762 mg
CHAPS	100 mg
Pharmalyte	62,5 µL
DTT	21,9 mg
ddH <sub>2</sub> O	ad. 5 mL

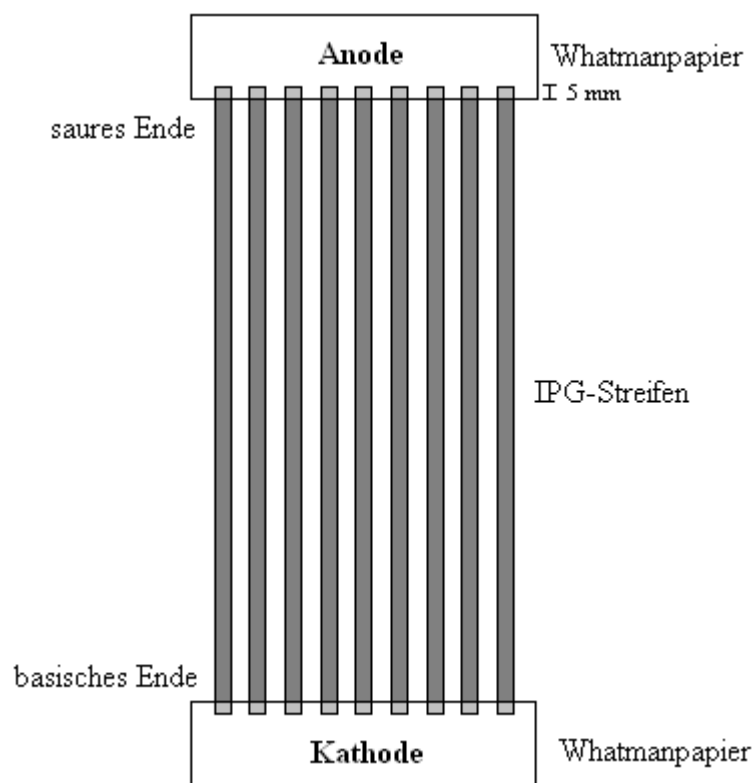
Die im Rehydratisierungspuffer enthaltenen Pharmalyte sorgen im entsprechenden pH-Bereich für einen Feingradienten auf dem IPG-Streifen, was zu einer besseren und genaueren Trennung beiträgt.

Man bereitet ein Rehydratisierungstray, mit der entsprechenden Menge an Probenschlitzen vor, und legt die aufgetauten IPG-Streifen ebenfalls bereit.

Die Proben-Lösungen wurden gleichmäßig an die seitliche Kante der Rehydratisierungskammer pipettiert. Die IPG-Streifen wurden von der Schutzfolie befreit und mit der Gelseite nach unten in die Probenschlitze auf die Proteinlösung gelegt. Die Streifen wurden noch mit 4 mL DryStripCover-Fluid überschichtet und mit einer Glasplatte abgedeckt. Danach mussten die Streifen mindestens 24 h bei RT rehydratisieren.

Nach dem Rehydratisieren wurden die Streifen auf die Multiphor II-Apparatur aufgelegt. Dazu wurden zunächst zwei Elektrodenstreifen auf die Maße von 4 x 11,5 cm zugeschnitten und die Elektroden gereinigt. Nach Zugabe von etwa 10 mL DryStripCover-Fluid auf die Kühlplatte des Systems wurde der IPG-Gelaufsatz luftblasenfrei aufgelegt. Zwischen die PVC-Schablone und die IPG-Kammer wurden nochmals 15 mL Öl eingefüllt. Die Temperatur der Wasserkühlung wurde auf 20 °C eingestellt.

Die IPG-Streifen wurden aus dem Rehydratisierungstray entnommen, kurz mit ddH<sub>2</sub>O abgespült und auf ein angefeuchtetes Whatmanpapier aufgelegt, um den überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Die IPG-Streifen wurden nun in die Rillen der PVC-Schablone gelegt, wobei auf die richtige Polung geachtet werden muss (saure Seite zur Anode). Die Papierelektroden wurden mit ddH<sub>2</sub>O angefeuchtet und auf die Streifen mit 5 mm Überlappung gelegt (**Abb. 3.4-2**). Anschließend wurden die Elektroden aufgelegt und dann vorsichtig angedrückt.



**Abb. 3.4-2:** Schematischer Aufbau der isoelektrischen Fokussierung

Die Streifen wurden mit DryStripCover-Fluid bedeckt, der Deckel geschlossen und das folgende Programm gestartet:

**Fokussierungsprogramm IPG-IEF**

1. Phase	Gradient	500V	1 mA	5 W	10 min
2. Phase		500V	1 mA	5 W	5 h
3. Phase	Gradient	3500V	1 mA	5 W	5 h
4. Phase		3500V	1 mA	5 W	25 h

### 3.4.2.9 Zweite Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE

Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt nach der Masse der einzelnen Proteine mittels SDS-PAGE (Abschnitt 3.4.1.4) und beruht darauf, dass anstelle der Herstellung diskreter Geltaschen, der komplette aus der ersten Dimension stammende IPG-Gelstreifen auf die Sammelgeloberfläche eines SDS-PAGE-Gels gelegt wird. Somit laufen die gemäß ihres pI an verschiedenen Positionen innerhalb des IEF-Gels fokussierten Proteine auch an verschiedenen Stellen des SDS-PAGE-Gels ein und werden dann im Verlauf dieser zweiten Dimension nach Größe getrennt. Dies bedeutet, dass auf dem resultierenden 2D-Gel auf gleichen Horizontalen laufende Proteine dieselbe Masse besitzen, während Proteine des gleichen pI auf denselben Vertikalen zu finden sind. Ein 2D-PAGE-Gel kann also als ein Koordinatensystem beschrieben werden, dessen Abszisse eine pI- und Ordinate eine MW-Skala besitzt. In diesem Koordinatensystem lässt sich im Idealfall, d.h. bei bekannter pI- und MW-Skala und idealem Laufverhalten, die Lage bekannter Proteine identifizieren. Zusätzlich zu deren pI und MW lassen sich die Protein-Spots aus dem Gel ausschneiden und N-terminal ansequenzieren (Abschnitt 3.4.2.15). Im Zusammenhang mit der Masse der Spots sind die Daten mit Referenzgelen aus dem Internet zu vergleichen. Die Gele können zusätzlich übereinander gelegt und mit einer von *Decodon* entwickelten Software (Delta2D 3.1) ausgewertet werden.

### 3.4.2.10 Gele gießen („Gelcasting“)

Für die Herstellung der Gele wurde ein Gelcaster (*BioRad*) verwendet, mit dessen Hilfe man bis zu 12 Gele gleichzeitig gießen konnte. Der Caster wurde mit der entsprechenden Anzahl an Gelglasplatten (*BioRad*) gefüllt und der restliche Platz mit Plexiglasspacern aufgefüllt. Darauf zu achten war, dass jeweils zwischen den Glasplatten und auch den Plexiglasplatten eine Plastikfolie gelegt wurde, um das Verkleben der Platten zu verhindern. Die

Gelglasplatten sind mit aufgeklebten Spacern an den Rändern versehen, so dass eine Geldicke von 1 mm gewährleistet war. Jeweils zwei Glasplatten sind mit einer Silikondichtung an der Seite wie ein „Buch“ verbunden.

Nachdem der Gelcaster aufgebaut war, wurde zunächst das Gemisch für das Trenngel (**Tab. 1**) vorbereitet und ganz zum Schluss erst die Radikalstarter TMEDA (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) hinzugegeben, um die Polymerisation zu starten. Dieses Gemisch wurde in ein Castingreservoir – ähnlich einem Trichter - überführt, der mit einem Schlauch an der unteren Seite des Gelcaster verbunden war. So wird es ermöglicht die Gele gleichzeitig und homogen von unten nach oben zu gießen. Der Flüssigkeitsspiegel wurde auf bis zu 2-3 cm an den oberen Rand des Casters laufen gelassen. Anschließend wurden die Gele von oben mit ca. 1-2 mL Isopropanol überschichtet, um eine glatte und auch blasenfrei Oberfläche zu erhalten. Das Trenngel wurde über Nacht zum Auspolymerisieren stehen gelassen und mit Folie und nassem Papier vor dem Austrocknen bewahrt.

	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele	4 Gele	2 Gele	1 Gel
2D-PAGE Aa/Baa	355,2 mL	296 mL	236,8 mL	177,6 mL	142 mL	71 mL	35,5 mL
2 M Tris pH 8,8	160,1 mL	133,4 mL	106,7 mL	80 mL	64 mL	32 mL	16 mL
dH <sub>2</sub> O	276,8 mL	230,6 mL	184,5 mL	138,4 mL	110,7 mL	55,35 mL	27,8 mL
10 % SDS-Lösung	8 mL	6,6 mL	5,3 mL	4 mL	3,2 mL	1,6 mL	0,8 mL
APS 10 %	2800 µL	2333,4 µL	1866,7 µL	1400 µL	1120 µL	560 µL	280 µL
TMED	426,6 µL	355,5 µL	284,4 µL	213,3 µL	170,64 µL	85,32 µL	42,66 µL

**Tab. 1:** Zusammensetzung des Trenngels

	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele	4 Gele	2 Gele	1 Gel
2D-PAGE Aa/Baa	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
0,5 M Tris pH 6,8	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
dH <sub>2</sub> O	55,8 mL	46,5 mL	28 mL	21 mL	14 mL	7 mL	3,5 mL
10 % SDS-Lösung	1109,4 µL	924,5 µL	554,7 µL	416 µL	277,3 µL	138,7 mL	69,3 µL
APS 10 %	277,38 µL	231,2 µL	138,7 µL	104 µL	69,35 µL	34,7 µL	17,4 µL
TMED	124,8 µL	104 µL	27,7 µL	20,8 µL	13,9 µL	6,9 µL	3,45 µL

**Tab. 2:** Zusammensetzung des Sammelgels

Bevor das Sammelgel gegossen werden konnte, musste das über dem Trenngel stehende Isopropanol entfernt, die Geloberfläche gründlich mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mit Whatmanpapierstreifen getrocknet werden. Das Sammelgel wurde dann von oben mit Hilfe einer Spritze und Kanüle auf die Trenngele aufgetragen. Dazu wurde wie für das Trenngel beschrieben das Gemisch für das Sammelgel (**Tab. 2**) vorbereitet und dann mit den Radikalstartern versetzt. Das Sammelgel wurde bis knapp unter den Rand des Casters

gegossen und dann wieder mit Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation nahm ca. 4-5 h in Anspruch.

#### 3.4.2.11 Äquilibration und Auflegen der IPG-Streifen

Nach dem Ende der Fokussierung wurden die IPG-IEF-Streifen für die zweite Dimension vorbereitet, indem sie äquilibriert wurden.

Dazu wurde jeweils 15 min in Äquilibrationlösung A und dann in B auf einem Gelschüttler inkubiert.

##### **Äquilibrationlösung**

Tris/HCl, pH 6,8 (0,5 M)	6 mL
Harnstoff	21,6 g
87 % Glycerol	18 mL
10 % SDS	24 mL
ddH <sub>2</sub> O	ad. 60 mL
<b>Zusätze für Äquilibrationlösung A</b>	
DTT	105 mg
<b>Zusätze für Äquilibrationlösung B</b>	
Bromphenolblau	10 mg

Nachdem die Streifen aus Lösung B genommen worden sind, wurden die äquilibrierten IPG-Streifen sofort auf die frisch gegossenen SDS-Gele für die zweite Dimension aufgelegt und mit 1 mL SDS-Agarose versiegelt.

##### **SDS-Agarose**

Tris/HCl, pH 6,8 (0,5 M)	25 mL
10 % SDS	1 mL
ddH <sub>2</sub> O	75 mL
Agarose	1 g

Wichtig war, dass zwischen den IPG-Streifen und dem Sammelgel keine Luftblasen eingeschlossen wurden, was für ein gleichmäßiges Laufen der Proteine unerlässlich ist, da eingeschlossene Luftblasen ein inhomogenes elektrisches Feld zur Folge haben.

#### 3.4.2.12 2D-PAGE-Lauf

Die vorbereiteten Gele wurden nun in die Protean Plus Dodeca Zelle (*Biorad*) für die zweite Dimension eingesetzt und bei konstanter Stromstärke für ca. 17 h laufen gelassen. Mit frisch



angesetztem Laufpuffer (ca. 30 L für eine Tankfüllung) wurde der Strom nach folgender Faustregel eingestellt: Pro Gel wurden ca. 20 mA über eine Zeit von 16,5 h angelegt.

Nach Entnahme der Gele aus der Protean Plus Dodeca Zelle wurden die Gele aus den Glasplatten entfernt und bei Bedarf mit dem Skalpell markiert.

#### **2D-PAGE-Laufpuffer**

Glycin	144 g
Tris	30 g
SDS	10 g
ddH <sub>2</sub> O	<i>ad.</i> 10 L

#### **3.4.2.13 Proteinanfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R-250**

Zum Anfärben von Proteinspots auf zuvor fixierten 2D-PAGE-Gelen bediente man sich der Anfärbung mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue R-250. Dieses Verfahren zeichnet sich durch ein proportionales Verhältnis zwischen Farbintensität und Proteingehalt der Spots aus. Die Anfärbung mittels Coomassie Brilliant Blue R-250 hat gegenüber der z.B. deutlich empfindlicheren Silberfärbung (Rabilloud, 1990) oder inversen Kupferfärbung (Lee *et al.*, 1987) einige Vorteile. Vor allem die Tatsache, dass der Coomassie Brilliant Blue R-250 Farbstoff im Gegensatz zu den Reagenzien der anderen Färbemethoden keinen störenden Einfluss auf die N-terminale Sequenzierung von aus den Gelen ausgeschnittenen Proteinspots hat, macht diese Färbevariante insbesondere für die präparative 2D-PAGE ausgesprochen interessant. Die zu färbenden Gele wurden zunächst vorsichtig bei RT 30-60 min in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt, dieser anschließend verworfen und durch Färber ersetzt. Der Fixiervorgang beruht auf einer Präzipitation der Proteinspots durch das entwässernd wirkende Methanol im sauren Milieu der Essigsäure und verhindert späteres Diffundieren der Banden bei längerer Lagerung der Gele. Die Gele wurden in dem Färber 1,5 h. bei RT geschwenkt und dieser danach wiederverwendet. Die Proteinspots konnten anschließend durch wiederholte Zugabe des Entfärbers und mehrstündige Inkubation sichtbar gemacht werden. Diese im Vergleich zu den angefärbt verbleibenden Proteinspots bevorzugte Entfärbung der Gelmatrix beruht auf einem Gleichgewichtsprozess, in dessen Verlauf der eingebrachte Farbstoff allmählich wieder in Lösung geht. Die erhaltenen Gele wurden zum Schluss gründlich mit Wasser gespült und bei 4 °C gelagert.

**2D-PAGE-Fixierer**

Methanol	50 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
ddH <sub>2</sub> O	40 % (v/v)

**2D-PAGE-Färber**

Ethanol	25 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,25 % (v/v)
ddH <sub>2</sub> O	65 % (v/v)

Der Färber muss filtriert werden, um nicht gelöstes Coomassie Brilliant Blue R-250 zu entfernen.

**2D-PAGE-Entfärber**

Ethanol	20 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)
ddH <sub>2</sub> O	70 % (v/v)

**3.4.2.14 Autoradiographie der <sup>35</sup>S-markierten Gele**

Die erhaltenen Gele aus der Gelelektrophorese wurden, nachdem sie 1 h in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt wurden, für 2 h in einem kontinuierlichen Wasserstrom gespült, um noch restliche Chemikalien wie Essigsäure zu entfernen. Zum Trocknen wurden jeweils 2 Gele auf vorbereitete Whatmanpapierstreifen (25 cm x 41,3 cm) gelegt. Jeweils 2 Streifen mit insgesamt 4 Gelen konnten auf den Gelrockner der Firma *FisherBrand* aufgelegt werden.

Getrocknet wurden die Gele für 1 h 30 min - 2 h bei 80 °C. Die getrockneten Gele wurden dann auf Röntgenfilme Biomaxx MR (*Kodak*) aufgelegt. Die Auflegezeiten richteten sich nach der auf ein Gel aufgetragenen Radioaktivität und dem Zeitpunkt des Auflegens.

Der Grundsatz für diese Zeiten ist eine gewünschte Vergleichbarkeit aller radioaktiven Filme. Dies wird durch eine gleiche Schwärzung und somit durch eine gleiche Dosis an Radioaktivität pro Gel erreicht.

Die Dosis ist proportional zur Radioaktivitätsmenge auf einem Gel und der Auflegezeit. Da in der Regel 600000 *cpm* pro Gel aufgetragen wurden, betrug die Auflegezeit 4 Tage nach der Bestimmung der Radioaktivitätsmenge („*Counten*“).

Allerdings, wenn nicht 600000 *cpm* auf ein Gel aufgetragen werden konnten oder nicht 4 Tage nach dem Counten der Proben mit der Zweidimensionalen Gelelektrophorese begonnen

wurde, ergeben sich die Auflegezeiten im allgemeinen Fall aus folgender Herleitung und daraus erhaltener Formel:

### Radioaktiver Zerfall:

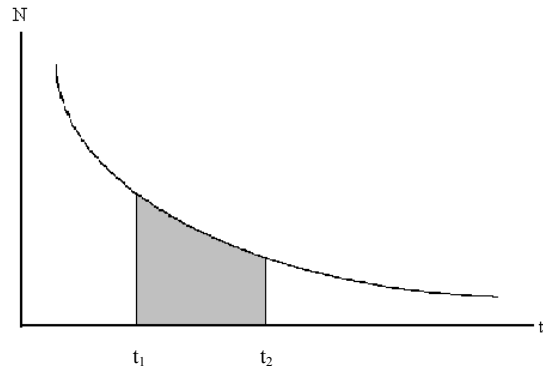
$t$  = Zeit

$N$  = Menge an Radioaktivität in *counts*

$N_0$  = Menge an Radioaktivität zur Zeit  $t = 0$

$N(t)$  = Menge an Radioaktivität zur Zeit  $t$

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t}$$



Frage: Wie groß ist die Menge an Radioaktivität im Zeitraum  $t_1 - t_2$ ? (Dosis?)

Lösung: Integration der Funktion  $N(t)$  von  $t_1$  bis  $t_2$

$$\begin{aligned} D &= \int_{t_1}^{t_2} N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left( -\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t} \right|_{t_1}^{t_2} \\ &= \left| N_0 \cdot \left( -\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t_1} - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t_2} \right|_{t_1}^{t_2} \end{aligned}$$

für  $t_1 = 0$  ergibt sich:

$$D = \int_0^t N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left( -\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot \left( 1 - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} \cdot t} \right) \right|$$

**Abb. 3.4-3:** Herleitung der Formel zur Berechnung der Dosis und Auflegezeit

Die gewünschte Dosis für eine angemessene Schwärzung der Filme wurde empirisch ermittelt und betrug 2,2 Millionen Dosispunkte.

Die aus den Boxen entnommenen Filme wurden durch Einschnitte gekennzeichnet und anschließend jeweils für 5 min in Entwickler und dann in Fixierer geschwenkt. Zwischen dem Entwickeln und Fixieren wurden die Filme gründlich mit Wasser gespült. Nach beendeter Entwicklung wurden die Filme noch ein weiteres Mal gespült und zum Trocknen für eine Nacht aufgehängt. Die trockenen Filme konnten nun eingescannt und so näher untersucht und interpretiert werden.

**Entwickler**

Kodak D-19 Entwicklerpulver	500 g
ddH <sub>2</sub> O	ad. 5 L

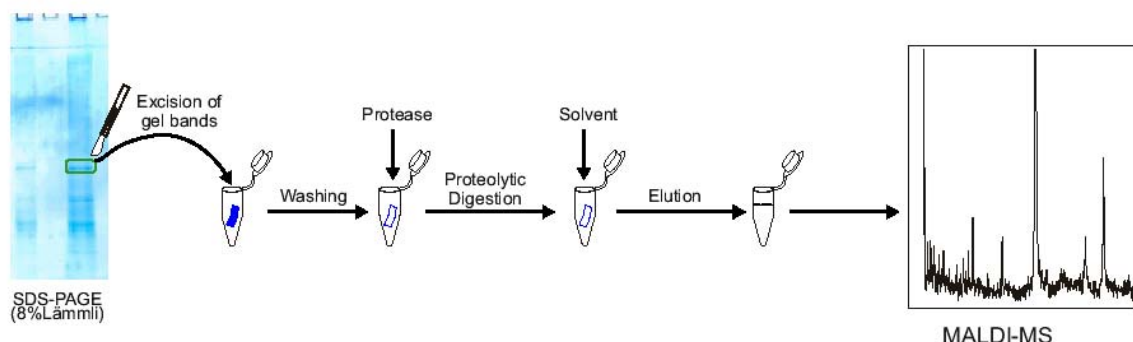
**Fixierer**

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	500 g
K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	50 g
ddH <sub>2</sub> O	ad. 2,5 L

**3.4.2.15 Tryptischer Verdau zur Proteinidentifizierung**

Die aus Abschnitt 3.4.2.13 erhaltenen Proteinspots wurden aus dem SDS-Gel geschnitten und mit 200 µL Waschlösung im Thermoschüttler entfärbt (600 Upm, 30 min, 37 °C). Die Waschlösung wurde entfernt und die Gelstücke in der SpeedVac getrocknet (30 min, 30 °C). Für den Trypsinverdau wurden die getrockneten Gelstücke mit 15-20 µL Trypsinlösung inkubiert (45 min, 37 °C) und der Überschuss entfernt. Das mit Trypsinlösung getränkte Gelstück wurde über Nacht inkubiert (16-18 h, 37 °C). Die Peptide wurden mit 20-25 µL Diffusionslösung im Ultraschallbad eluiert (45 min, RT).

Die Proben wurden mittels Nano-LC-MS analysiert. Ein Abgleich der Fingerprintsequenzen erfolgte mit der Datenbank MASCOT. Der Verlauf der Identifizierung ist in **Abb. 3.4-4** schematisch dargestellt.



**Abb. 3.4-4:** Proteinidentifizierung mittels tryptischen Verdau

**Waschlösung**

NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	200 mM
CH <sub>3</sub> CN	50 % (v/v)

**Trypsinlösung**

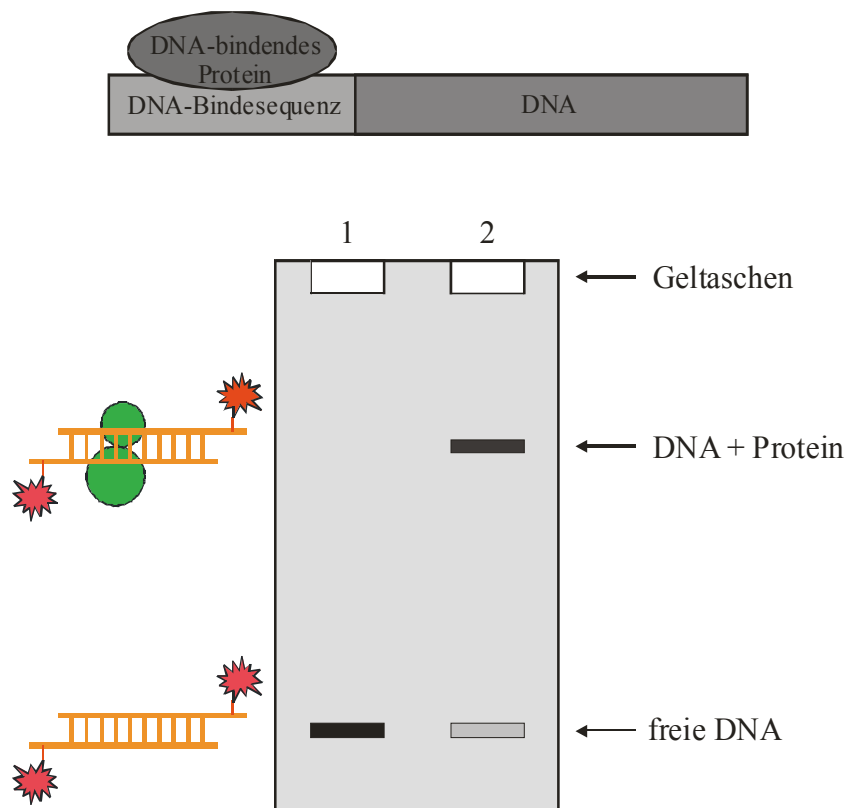
Trypsin	0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
$\text{NH}_4\text{HCO}_3$	10 % (v/v)
$\text{CH}_3\text{CN}$ , pH 8,1	10 % (v/v)

**Diffusionslösung**

Trifluoressigsäure	1 % (v/v)
$\text{CH}_3\text{CN}$ , pH 8,1	10 % (v/v)

**3.4.3 Protein-Assays****3.4.3.1 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)**

Der EMSA oder Gelshift wird im Allgemeinen benutzt, um Genregulation und DNA-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. In dieser Arbeit stand die DNA-Protein-Interaktion im Vordergrund. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass freie DNA schneller durch ein natives Acrylamidgel wandert als der Komplex aus Protein mit gebundener DNA (**Abb. 3.4-5**).



**Abb. 3.4-5:** a) Schema des DNA-Protein-Komplexes; b) schematischer Gelshift

Der Gelshift wurde nach folgender Vorschrift durchgeführt (Kruger und Hecker, 1998).

#### **Gelshift-Ansatz**

Tris/HCl, pH 8,0 (0,1 M)	6 µL
KCl (1 M)	1,5 µL
30 % Ficoll	3 µL
EDTA (0,27 M)	2,2 µL
DTT (15 mM)	1 µL
DNA	x µg
Protein	x µg
ddH <sub>2</sub> O	ad. 30 µL

Der Ansatz wurde zusammenpipettiert und inkubiert (20 min, 30 °C). Anschließend wurden die einzelnen Proben über ein 5 % natives Acrylamidgel getrennt und mit EtBr gefärbt. Zu beachten war, dass die nativen Gele zur Entfernung störender Ionen 2 h vorlaufen mussten (15 mA/Gel). Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht visualisiert.

#### **5 % natives Trenngel (8 Gele)**

Acrylamid-Lösung	10 mL
10x TBE	6 mL
40 % Glycerol	7,5 mL
ddH <sub>2</sub> O	36,5 mL
TMEDA	30 µL
10 % APS	300 µL

#### **4 % natives Sammelgel (8 Gele)**

Acrylamid-Lösung	4 mL
10x TBE	3 mL
40 % Glycerol	3,75 mL
ddH <sub>2</sub> O	19,25 mL
TMEDA	15 µL
10 % APS	150 µL

### **3.4.3.2 Aktivitätsassay für die Acetolactat Synthase aus *Bacillus subtilis***

Für die Aktivitätsbestimmung der gereinigten Acetolactat Synthase (IlvBH) wurde nach Holtzclaw (Holtzclaw und Chapman, 1975) vorgegangen.

Hierbei katalysiert das Enzym die Kondensation zweier Pyruvatmoleküle unter Decarboxylierung zu Acetolactat. Um die Menge an gebildetem Acetolactat zu bestimmen, wurde dieses mit Schwefelsäure zu Acetoin umgewandelt. Die Menge an Acetoin wurde mittels Voges-Proskauer-Test bestimmt (Grundy *et al.*, 1993).

**Assay-Puffer**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

Für die Reaktion wurde 10 mM Natriumpyruvat eingesetzt und mit 0,2 mM Thiaminpyrophosphat versetzt und auf 333 µL mit Assay-Puffer aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms gestartet und inkubiert (1-15 min, 37 °C). Die Zugabe von 6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> stoppte die Reaktion durch Ausfällung des Enzyms und wandelte das gebildete Acetolactat durch Decarboxylierung in Acetoin um. Das ausgefällte Enzym wurde präzipitiert (13000 Upm, 5 min, RT) und der Überstand weiter inkubiert (30 min, 37 °C). Der Überstand wurde mit jeweils 333 µL Kreatin-Lösung und 333 µL α-Naphthol-Lösung versetzt und inkubiert (15 min, 37 °C). Die Absorption wurde bei 530 nm detektiert, wobei 0,4 Abs 60 nmol Acetoin bzw. Acetolactat in einem Endvolumen von 1 mL entsprach.

**Kreatin-Lösung**

Kreatin	0,5 g
ddH <sub>2</sub> O	<i>ad.</i> 100 mL

**α-Naphthol-Lösung**

α-Naphthol	5 g
NaOH (2,5 M)	<i>ad.</i> 100 mL

**NaOH-Lösung (2,5 M)**

NaOH	10 g
ddH <sub>2</sub> O	<i>ad.</i> 100 mL

## 4. Ergebnisse

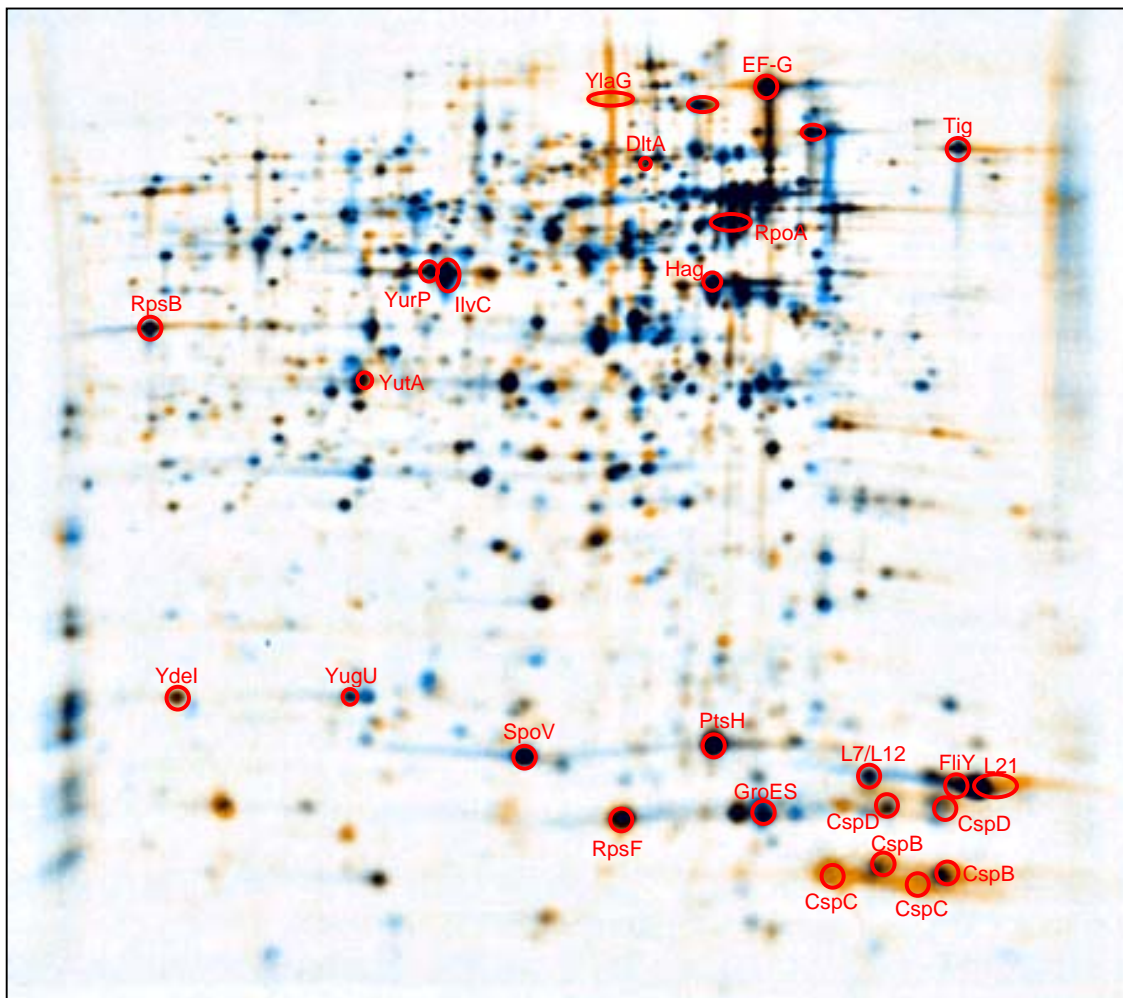
### 4.1 Identifizierung kälteinduzierter Proteine und Gene in *Bacillus subtilis*

Viele wichtige Komponenten wie die Struktur und Funktion der CSPs (Schindelin *et al.*, 1993), ihr Zusammenspiel mit den kälteinduzierten DEAD-Box RNA-Helikasen (Hunger *et al.*, 2006) oder die Regulation der Fettsäuredesaturase Des durch das Zweikomponentensystem DesKR (Aguilar *et al.*, 2001, Hunger *et al.*, 2004) wurden im Rahmen der Kälteschockantwort bereits untersucht. Außerdem gab es Ansätze zur Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine in frühen Untersuchungen durch zweidimensionale Gelelektrophorese (Graumann und Marahiel, 1996, Wiegeshoff, 2003) und durch genomweite Transkriptionsanalysen (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002), die unter anderem die hohe Induktion der DNA-Gyrase, die den negativen *supercoil* in die DNA einführt, und Y-Genen mit unbekannter Funktion wie *yplP* zeigten. In diesem Zusammenhang sollten aufgrund der früheren Untersuchungen sowohl das Proteom als auch das Transkriptom von *B. subtilis* nach Kälteschock durch die verbesserten Methoden der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der DNA-Mikroarrays untersucht werden. Die Transkriptionsanalyse durch DNA-Arrays bietet den Vorteil, dass alle Gene zugänglich sind und so keine Rücksicht auf eventuelle Löslichkeit oder Lokalisation (z.B. Membran) von Proteinen genommen werden muss, die bei der Proteomanalyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese nur eine beschränkte Sicht auf das Proteinbild der Zelle gibt. Die zweidimensionale Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit pH-Bereiche wie pH 4-7 in kleinere Bereiche aufzuspreizen, um die Auflösung zu erhöhen und so einen detaillierteren Einblick in das Proteom von *B. subtilis* JH642 zu erhalten. Es ist das Ziel dieser Untersuchungen durch die Kombination beider Methoden eine umfassende Identifizierung kälteinduzierter Proteine und Gene in *B. subtilis* nach Kälteschock durchzuführen. Die Identifizierung dieser kälteinduzierten Proteine und Gene ermöglicht weitere Untersuchungen, die die Bedeutung dieser Proteine und Gene für die Anpassung an die Kälte klären könnten. Daher sollten die erhaltenen Gene und Proteine auf ihre Relevanz für die Kälteanpassung von *B. subtilis* durch Gendelektionen und anschließende Wachstumsexperimente untersucht werden.



#### 4.1.1 Proteomanalyse von kältegeschocktem *Bacillus subtilis* JH642 durch Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Identifizierung kälteinduzierter Proteine wurden  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteinproben von exponentiell wachsenden *B. subtilis* JH642 Kulturen vor und nach Kälteschock von 37 °C auf 15 °C miteinander verglichen (Abschnitt 3.4.2). Dazu wurden alle löslichen Proteine der Proben zunächst durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach pI und Masse getrennt und autoradiographiert. Die entwickelten Filme wurden anschließend elektronisch gescannt und für die optische Auswertung computergesteuert überlagert. In dieser Überlagerung werden die Mengenunterschiede der zu vergleichenden Proben farblich hervorgehoben (**Abb. 4.1-1**) (Beckering, 2004).



**Abb. 4.1-1:** Beispiel für die Überlagerung der 2D-Gele von  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinen aus *Bacillus subtilis* JH642 bei 37 °C und 15 °C in einem pH-Bereich von 4-7

orange: kälteinduzierte, blau: kältereprimierte, schwarz: unveränderte Proteine

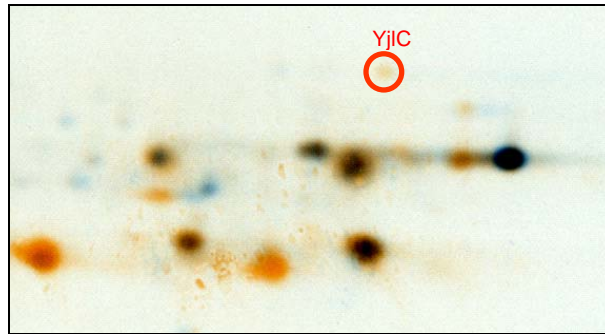
Diese farbliche Überlagerung der  $^{35}\text{S}$ -markierten Proteinproben aus *B. subtilis* bei 37 °C und 15 °C ermöglicht eine schnelle und zuverlässige Beurteilung der Induktion bzw. Repression des Proteinbildes. Besonders deutlich tritt die Induktion der CSPs hervor (**Abb. 4.1-1** rechts unten), die zu den am stärksten kälteinduzierten Proteinen gehören und ein gutes Beispiel für die Übereinstimmung von zweidimensionaler Gelelektrophorese und DNA-Arrays ist, weil die Gene *cspB cspC cspD* auch transkriptionell stark induziert sind (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002, Phadtare und Inouye, 2004). Eine weitere Erkenntnis aus den Kälteschockexperimenten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ist die deutliche Abnahme der Proteinbiosynthese nach einem Kälteschock, was sich durch die große Menge an reprimierten (blauen) Proteinspots zeigt (**Abb. 4.1-1**).

Die Identifizierung der Proteine erfolgte aus coomassiegefärbten Gelen nach tryptischen Verdau (Abschnitt **3.4.2.15**) durch Massenspektrometrie in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Linne (AG Marahiel, Marburg). Alle Experimente wurden mindestens dreimal reproduziert, um die Ergebnisse statistisch zu sichern.

Um nun einen detaillierteren Blick in das Proteom von *B. subtilis* werfen zu können, wurden Aufspreizungen des pH-Bereichs vorgenommen. Dadurch können auch Proteinspots, die im pH-Bereich 4-7 überlagert sind, besser aufgelöst werden. Die Aufspreizungen wurden in den pH-Bereichen von 4-5 und 5-6 durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Karen Hunger, AG Marahiel, Marburg).

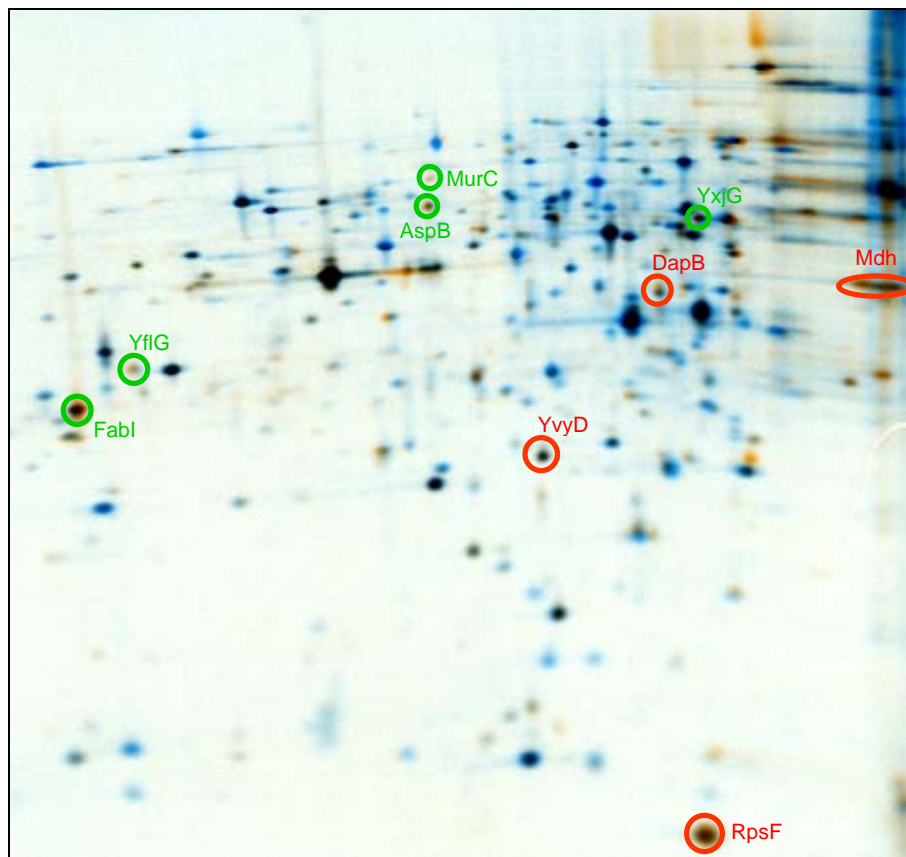
#### **4.1.1.1 2D-Gele im pH-Bereiche 4-5 und 5-6**

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Karen Hunger durchgeführt. Es sollten generell kälteinduzierte Proteine (diese Arbeit) und Proteine, deren Kälteinduktion von der Zunahme des negativen *supercoils* der DNA in der Kälte abhängt (Hunger, 2006), identifiziert werden. Dafür wurden die bereits erwähnten Aufspreizungen in die pH-Bereiche von 4-5 und 5-6 vorgenommen. Nachfolgend sind die Überlagerungen der Aufspreizungen in den einzelnen Bereichen gezeigt (**Abb. 4.1-2** und **Abb. 4.1-3**).



**Abb. 4.1-2:** Ausschnitt aus 2D-PAGE im pH-Bereich 4-5

orange: kälteinduzierte, blau: kältereprimierte, schwarz: unveränderte Proteine



**Abb. 4.1-3:** Ausschnitt aus 2D-PAGE im pH-Bereich 5-6

orange: kälteinduzierte, blau: kältereprimierte, schwarz: unveränderte Proteine

rot: generell kälteinduzierte, grün: Gyrase-abhängige kälteinduzierte Proteine

Die mit grün markierten Proteinspots sind einige der Proteine, deren Kälteinduktion vom negativen *supercoil* der DNA abhängt. Die genaue Auswertung dieser Gyrase-abhängigen Proteine ist in der Doktorarbeit von Karen Hunger nachzulesen (Hunger, 2006). Die rot markierten Proteinspots sind generell kälteinduziert und Teil dieser Arbeit. Eine gesamte Liste aller identifizierten Proteine ist in der nachfolgenden Tabelle zu sehen (**Tab. 4.1-1**).

Protein	pH-Bereich	Gyrase-abhängig	Funktion
SpeB	4-5	ja	Agmatinase beteiligt an der Spermidin und Polyamin Biosynthese
YheA	4-5	ja	unbekannt
YjlC	4-5	nein	unbekannt
YwqH	4-5	ja	unbekannt
AspB	5-6	ja	Biosynthese von L-Aspartat (Aspartat Transaminase)
DapB	5-6	nein	Dihydrodipiconilat Reduktase
FabI	5-6	ja	Enoyl-Acyl-Trägerprotein involviert in Elongation der Fettsäuren
Mdh	5-6	nein	Malatdehydrogenase
MurC	5-6	ja	Peptidoglykan Biosynthese (UDP-N-Acetylmuramat-Alanin Ligase)
RpsF	5-6	nein	ribosomales Protein S6 (BS9)
YflG	5-6	ja	unbekannt
YxjG	5-6	ja	unbekannt
YvyD	5-6	nein	Ähnlich zu $\sigma^{54}$ -modulierenden Faktoren aus gram-negativen Bakterien

**Tab. 4.1-1:** Liste aller kälteinduzierten Proteine

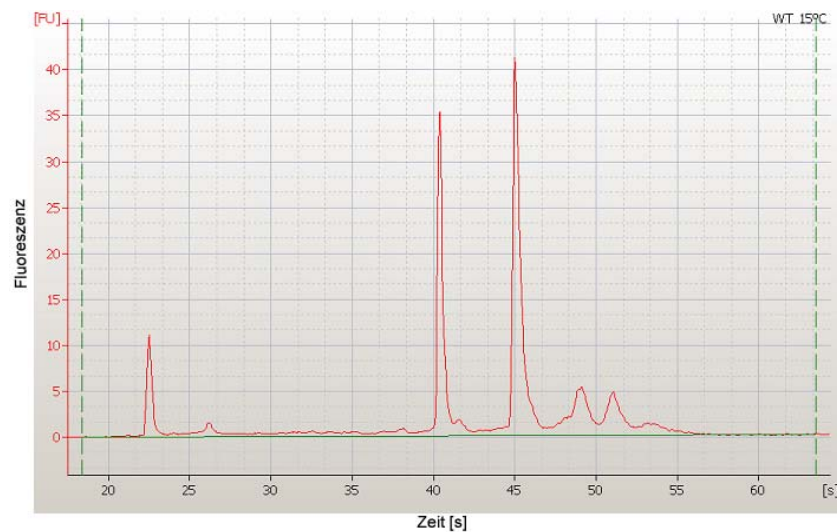
Im Weiteren sollten Deletionsmutanten von Genen generell kälteinduzierter Proteine konstruiert und die erhaltenen Deletionsmutanten auf ihre Wachstumseigenschaften bei niedrigen Temperaturen hin untersucht werden (Abschnitt 4.1.3), um ihre mögliche Beteiligung an der Kälteanpassung von *B. subtilis* zu klären.

#### 4.1.2 Genomweite Transkriptionsanalyse von kältegeschocktem *Bacillus subtilis* JH642 durch DNA-Arrays

Zur Identifizierung der kälteinduzierten und auch -reprimierten Gene sollte eine genomweite Transkriptionsanalyse durchgeführt werden. Dazu sollten Transkriptionsdaten von Kulturproben aus *B. subtilis* JH642 vor und nach einem Kälteschock miteinander verglichen werden, um eine Liste der gesuchten Gene aus dem gesamten Chromosom von *B. subtilis* zu erstellen.

Für die genomweite Transkriptionsanalyse des Wildtyps *B. subtilis* JH642 wurden Kulturproben von *B. subtilis* JH642 bei 37 °C und 15 °C entnommen, gesamtRNA isoliert und

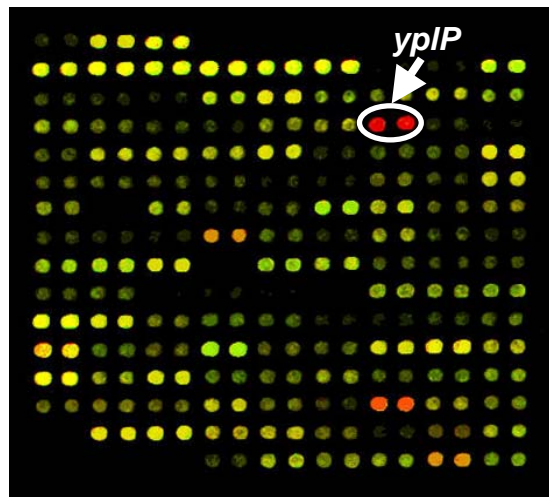
gereinigt (Abschnitt 3.3.1). Zur Bestimmung der Qualität, der aus den Kulturproben für die DNA-Arrays präparierten gesamtRNA, wurde eine Kapillarelektrophorese durchgeführt.



**Abb. 4.1-6:** Kapillarelektrophorese zur Qualitätskontrolle der mRNA

Bei der Kapillarelektrophorese einer intakten RNA-Probe sind deutlich zwei prominente Peaks der 16S und der 23S RNA zu erkennen (**Abb. 4.1-3**). Das Verhältnis der Fläche der beiden Peaks gibt Aufschluss über die Qualität bzw. die Degradation der RNA. Der Idealfall wäre ein Verhältnis von 1:2. In diesem Fall liegt es bei 1:1,6 und die RNA hatte demnach eine gute Qualität für die nachfolgende Transkriptionsanalyse.

Die mRNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und fluoreszenzmarkiert (Abschnitt 3.3.3.2). Diese markierte cDNA wurde dann mit den DNA-Array slides mit *B. subtilis* Genen hybridisiert (Abschnitt 3.3.3.4) und die Signale auf den Arrays anschließend mit einem Fluoreszenzscanner detektiert. Dieser Vorgang wurde für jeweils drei unabhängige Proben wiederholt, so dass für die computergestützte Auswertung drei Parallelen genutzt werden konnten, um die Ergebnisse statistisch zu sichern. Ein repräsentativer Ausschnitt eines Falschfarbenoverlays der Arrays für den direkten Vergleich von *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock ist in **Abb. 4.1-4** dargestellt.



**Abb. 4.1-7:** Ausschnitt aus dem Overlay der Falschfarbendarstellung der DNA-Arrays

rot : induzierte, grün: reprimierte, gelb: unveränderte mRNA-Mengen

(alle Gene sind zur Reproduktion doppelt nebeneinander gespottet)

Zweifach höhere oder niedrigere mRNA-Mengen bei dem Vergleich der 37 °C und der 15 °C Probe von *B. subtilis*, wurden als signifikante Veränderungen durch den Kälteschock betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass sich eine Gruppe von ca. 130 unterschiedlich stark kälteinduzierten und eine weitaus größere Gruppe von ca. 250 kältereprimierten Genen nach 70 min Kälteschock aus den Arraydaten ergibt. Unter den kälteinduzierten Genen ist etwa die Hälfte von bislang unbekannter Funktion. Diese unbekannten Gene wurden während der Sequenzierung verschiedenster Organismen als „Y“-Gene klassifiziert, was sich aus dem Englischen ableitet (engl. „why“-genes = Y-genes). Gerade in dieser Gruppe befinden sich möglicherweise Gene, deren Proteine auf noch nicht charakterisierte Weise eine Rolle in der Kälteschockanpassung von *B. subtilis* spielen. Sie sind deshalb interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen. Eine Auswahl von kälteinduzierten und –reprimierten Genen ist in **Tab. 4.1-1** dargestellt.

Gen (Induktion 15°C/37°C)	Genprodukt (Funktion)
<b><u>bekannte kälteinduzierte Y-Gene</u></b>	
<i>yplP</i> (9,8)	putativer $\sigma^L$ -abhängiger Transkriptionsaktivator
<i>ylaG</i> (5,0)	homolog zu GTP bindenden Elongationsfaktoren
<i>ydeB</i> (6,7)	unbekannt
<i>yhfH</i> (11,9)	unbekannt
<i>ydjO</i> (5,4)	unbekannt
<i>veg</i> (4,9)	unbekannt
<i>ytrA</i> (7,2), <i>ytrB</i> (24,0), <i>ytrC</i> (7,8), <i>ytrD</i> (9,0), <i>ytrE</i> (8,9), <i>ytrF</i> (7,7)	homolog zu ABC Transporter (Hunger, 2002)



**weitere kälteinduzierte Y-Gene**

<i>ydhM</i> (11,9)	unbekannt
<i>ywaC</i> (5,8)	unbekannt
<i>ybaF</i> (4,9)	unbekannt
<i>yscB</i> (4,3)	unbekannt
<i>ybaE</i> (4,1)	unbekannt
<i>yshA</i> (3,7)	unbekannt
<i>ysbA</i> (2,7)	unbekannt

**bekannte kälteinduzierte Gene**

<i>des</i> (10.7)	Fettsäuredesaturase Des
<i>desK</i> (11.9)	Histidinkinase DesK (Regulation von <i>des</i> )
<i>desR</i> (18.5)	Responsregulator DesR (Regulation von <i>des</i> )
<i>cspB</i> (2.3)	Hauptkälteschockprotein CspB
<i>cspC</i> (9.1)	Kälteschockprotein CspC
<i>cspD</i> (1.9)	Kälteschockprotein CspD
<i>deaD</i> (2,2), <i>ydbR</i> (2.6), <i>yqfR</i> (2.3)	DEAD-Box RNA-Helikasen
<i>dltA</i> (2,4)	D-Alanyl-D-Alanin Trägerprotein Ligase
<i>sigL</i> (2,5)	Sigmafaktor L
<i>rbfA</i> (2.6)	Ribosomaler Bindefaktor
<i>rplF</i> (2,2), <i>rplN</i> (2,3), <i>rplO</i> (2,7), <i>rplP</i> (2,1), <i>rplR</i> (2,2), <i>rplX</i> (2,3), <i>rpmC</i> (2,1), <i>rpmD</i> (2,5), <i>rpmE</i> (2,1), <i>rpmJ</i> (2,9), <i>rpsC</i> (2,0), <i>rpsD</i> (2,1), <i>rpsE</i> (2,4), <i>rpsH</i> (2,4), <i>rpsK</i> (2,1), <i>rpsM</i> (2,3), <i>rpsN</i> (2,2), <i>rpsP</i> (2,8), <i>rpsQ</i> (2,1), <i>rpsS</i> (2,1)	Ribosomale Proteine
<i>infA</i> (2,5), <i>infB</i> (2,4)	Initiationsfaktor IF1 und IF2
<i>gyrA</i> (3,1), <i>gyrB</i> (3,0)	DNA-Gyrase

**bekannte kältereprimierte Gene**

<i>topA</i> (0.5)	DNA Topoisomerase I
<i>hrcA</i> (0.3)	Transkriptionsregulator (CIRCE)
<i>grpE</i> (0,2), <i>dnaK</i> (0,3), <i>dnaJ</i> (0,5), <i>yqeT</i> (0,4), <i>yqeU</i> (0,5)	Chaperone (Klasse I Hitzeschockgene)
<i>groEL</i> (0,1), <i>groES</i> (0,1)	Chaperone (Klasse I Hitzeschockgene)
<i>clpP</i> (0,3)	Clp Protease Untereinheit (Klasse III Hitzeschockgen)
<i>ahpC</i> (0,5), <i>ahpF</i> (0,4)	Alkylhydroperoxidreduktase (Klasse IV Hitzeschockgen)
<i>argB</i> (0,4), <i>argC</i> (0,3), <i>argD</i> (0,5), <i>argG</i> (0,3), <i>argF</i> (0,9), <i>argH</i> (0,4), <i>argJ</i> (0,3), <i>aroA</i> (0,1), <i>aroB</i> (0,8), <i>aroD</i> (0,8), <i>aroH</i> (0,9), <i>asd</i> (0,3), <i>aspB</i> (0,6), <i>carA</i> (0,5), <i>dapB</i> (0,5), <i>dapG</i> (0,4), <i>glnA</i> (0,4), <i>gltA</i> (0,7), <i>gltB</i> (0,7), <i>glyA</i> (0,3), <i>hom</i> (0,7), <i>ilvD</i> (0,5), <i>metE</i> (0,4), <i>proA</i> (0,7), <i>proB</i> (0,6), <i>proH</i> (0,4), <i>proI</i> (0,7), <i>proJ</i> (0,5), <i>serA</i> (0,4), <i>serC</i> (0,2), <i>thrB</i> (0,6), <i>thrC</i> (0,5)	Aminosäurebiosynthese

<i>argS</i> (0,8), <i>hisS</i> (0,5), <i>metS</i> (0,5), <i>thrS</i> (0,8)	tRNA-Synthetasen
<i>purF</i> (0,4), <i>purN</i> (0,7), <i>purQ</i> (0,3), <i>purL</i> (0,4), <i>purM</i> (0,6), <i>purK</i> (0,3), <i>purE</i> (0,3), <i>purC</i> (0,5), <i>purB</i> (0,2), <i>guaB</i> (0,2), <i>ndK</i> (0,9)	Purinbiosynthese
<i>pyrAA</i> (0,6), <i>pyrAB</i> (0,8), <i>pyrB</i> (0,7), <i>pyrC</i> (0,7)	Pyrimidinbiosynthese
<i>nifS</i> (0,6), <i>nadB</i> (0,5), <i>nadC</i> (0,6), <i>nadE</i> (0,6)	NAD Biosynthese
<i>upp</i> (0,5)	Uracil Phosphoribosyltransferase (Pyrimidineaufnahme)
<i>prs</i> (0,3)	Phosphoribosyl-Pyrophosphate Synthetase
<i>pgi</i> (0,5), <i>pgk</i> (0,8)	Glycolyse
<i>pdhA</i> (0,4), <i>pdhB</i> (0,3), <i>pdhC</i> (0,6), <i>pdhD</i> (0,6)	Pyruvat Dehydrogenase
<i>sucC</i> (0,4), <i>sdhC</i> (0,4), <i>citG</i> (0,5)	Zitronensäurezyklus
<i>atpA</i> (0,4), <i>atpB</i> (0,2), <i>atpC</i> (0,8), <i>atpD</i> (0,8), <i>atpE</i> (0,3), <i>atpF</i> (0,5), <i>atpG</i> (0,5), <i>atpH</i> (0,3), <i>atpI</i> (0,5)	ATP Synthase

**Tab. 4.1-2:** Transkriptionsprofil von *B. subtilis* JH642 Genen nach 70 min Kälteschock von 37 °C auf 15 °C

Die ausführliche Auswertung des Transkriptionsprofils der in **Tab. 4.1-1** aufgeführten Gene erfolgt in der Diskussion. Die Arraydaten stimmen in Bezug auf die Induktion bekannter Kälteschockgene und die Repression von Hitzeschockgenen mit den Erwartungen überein und decken sich mit früheren Studien des Transkriptoms von *B. subtilis* (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002). Die Arraydaten werden auch durch Ergebnisse aus Untersuchungen von kältegeschocktem *B. subtilis* durch zweidimensionale Gelelektrophorese (Abschnitt 4.1.2) und frühere Proteomuntersuchungen bestätigt (Graumann und Marahiel, 1996, Wiegeshoff, 2003). Im Weiteren sollten Deletionsmutanten der am höchsten kalteinduzierten Y-Gene konstruiert (Abschnitt 4.1.3) und die erhaltenen Deletionsmutanten auf ihre Wachstumseigenschaften hin untersucht werden (Abschnitt 4.1.4), um zu klären, ob die Genprodukte der entsprechenden Gene das Wachstum in der Kälte unterstützen.

#### 4.1.3 Konstruktion der Deletionsmutanten aus *Bacillus subtilis* JH642

Die aus den Abschnitten 4.1.1 und 4.1.2 erhaltenen kalteinduzierten Proteine und Gene sollten nun näher untersucht werden. Hierfür sollten Deletionsmutanten der entsprechenden Gene erstellt und diese im Wachstum im Vergleich zum Referenzstamm JH642 analysiert werden, um die Relevanz der Genprodukte für die Kälteanpassung des *B. subtilis* zu klären.



#### 4.1.3.1 Konstruktion der *yjlC* Deletionsmutante FW11

Die Konstruktion von FW11 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yjlC* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yjlC*-P1 und *yjlC*-P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yjlC*-P3 und *yjlC*-P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yjlC* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.2 Konstruktion der *yvyD* Deletionsmutante JW1

Die Konstruktion von JW1 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yvyD* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yvyD*\_P1 und *yvyD*\_P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yvyD*\_P3 und *yvyD*\_P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yvyD* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.3 Konstruktion der *ybaE* Deletionsmutante FW23

Die Konstruktion von FW23 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ybaE* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ybaE*\_P1 und *ybaE*\_P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ybaE*\_P3 und *ybaE*\_P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ybaE* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.4 Konstruktion der *ydhM* Deletionsmutante FW24

Die Konstruktion von FW24 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydhM* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ydhM*\_P1 und *ydhM*\_P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ydhM*\_P3 und *ydhM*\_P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ydhM* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.5 Konstruktion der *ysbA* Deletionsmutante FW25

Die Konstruktion von FW25 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ysbA* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ysbA\_P1* und *ysbA\_P2* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ysbA\_P3* und *ysbA\_P4* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ysbA* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.6 Konstruktion der *ywaC* Deletionsmutante FW26

Die Konstruktion von FW26 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ywaC* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ywaC\_P1* und *ywaC\_P2* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ywaC\_P3* und *ywaC\_P4* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ywaC* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.7 Konstruktion der *yshA* Deletionsmutante FW27

Die Konstruktion von FW27 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yshA* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yshA\_P1* und *yshA\_P2* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yshA\_P3* und *yshA\_P4* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yshA* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.3.8 Konstruktion der *yscB* Deletionsmutante FW28

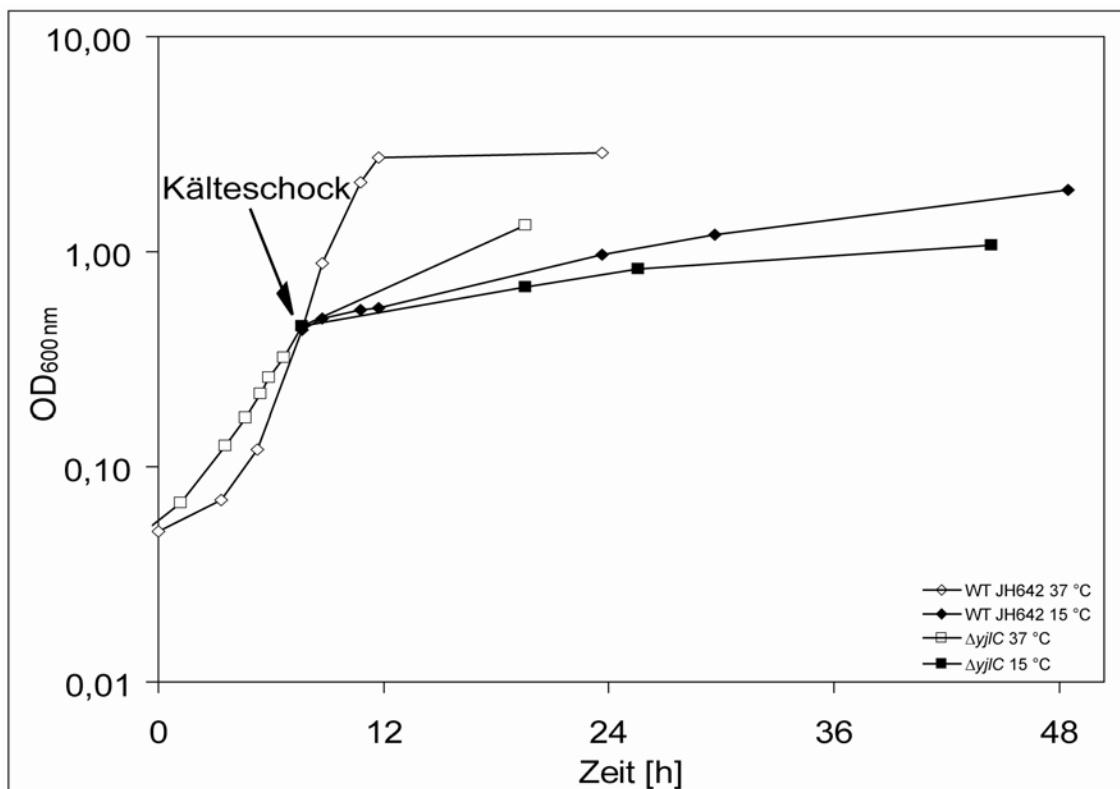
Die Konstruktion von FW28 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yscB* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yscB\_P1* und *yscB\_P2* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yscB\_P3* und *yscB\_P4* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yscB* mit PCR kontrolliert. Die Mutante wird für weitere Wachstumsexperimente in Abschnitt 4.1.4 verwendet.

#### 4.1.4 Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten aus *Bacillus subtilis* JH642

In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die konstruierten Mutanten des *B. subtilis* JH642 aus Abschnitt 4.1.3 in ihrem Wachstum nach einem Kälteschock untersucht (Abschnitt 3.1.2). Hierzu wurden die Stämme entsprechend der Auxotrophien des Stammes JH642 (Abschnitt 2.4) in SMM-Medium mit den entsprechenden Mengen an Zusätzen (Abschnitt 2.5) wachsen gelassen. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsanalysen wurden mindestens dreimal reproduziert.

##### 4.1.4.1 Wachstumseigenschaften der *yjlC* Deletionsmutante FW11

Aufgrund der gezeigten Kälteinduktion von YjlC auf Proteinebene, sollte die Relevanz des Genproduktes von *yjlC* für die Kälteanpassung geklärt werden. Hierzu wurde die konstruierte *yjlC* Deletionsmutante FW11 von *B. subtilis* JH642 (Abschnitt 4.1.3) in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C analysiert. Nachfolgend ist die Wachstumskurve der *yjlC* Deletionsmutante im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 gezeigt.

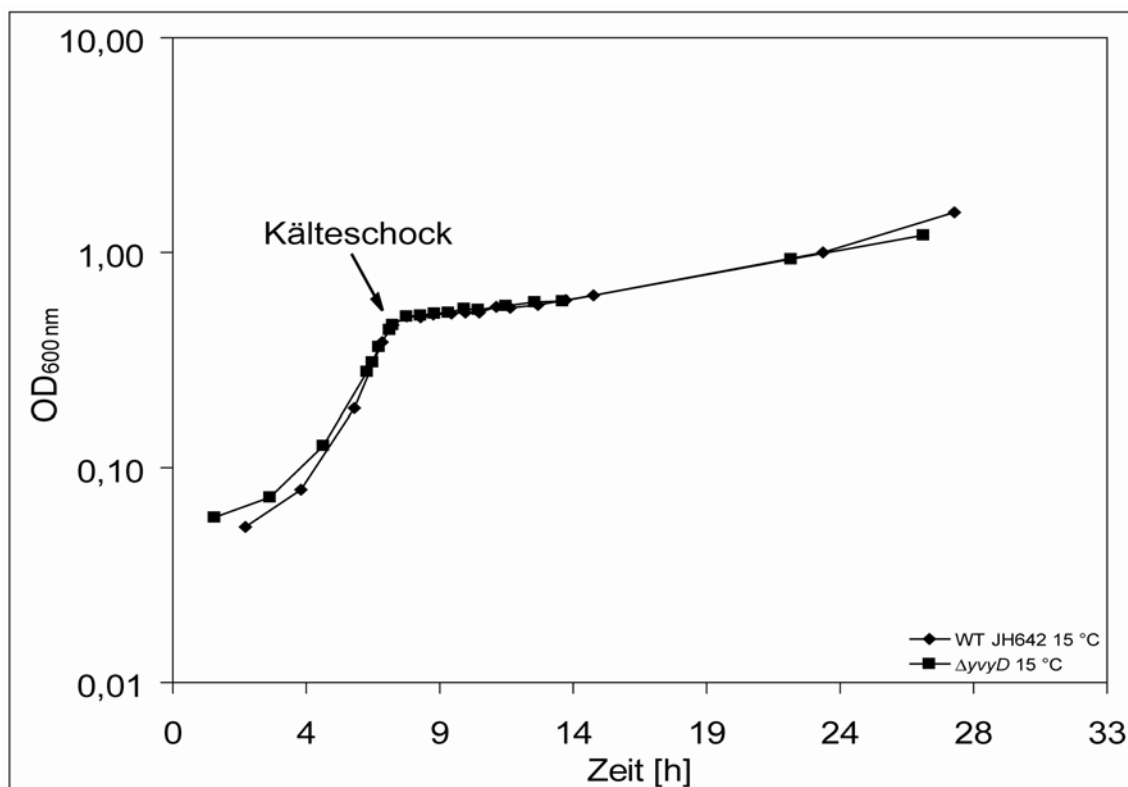


**Abb. 4.1-4:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642 und  $\Delta yjlC$  (FW11) bei 37 °C und 15 °C

Wie in der Wachstumskurve zu erkennen ist, hat die Deletion von *yjlC* nicht nur in der Kälte eine Auswirkung auf das Wachstum des *B. subtilis* JH642. Es war zu beobachten, dass die Mutante im Vergleich zum Kontrollstamm JH642 bei 37 °C um ein vielfaches langsamer wächst. Auch nach dem Kälteschock zeigte sich über eine Zeit von 48 Stunden ein verlangsamtes Wachstum der *yjlC* Deletionsmutante im Vergleich zum Kontrollstamm JH642.

#### 4.1.4.2 Wachstumseigenschaften der *yvyD* Deletionsmutante JW1

Aufgrund der gezeigten Kälteinduktion von YvyD auf Proteinebene, sollte die Relevanz des Genproduktes von *yvyD* für die Kälteanpassung geklärt werden. Hierzu wurde die konstruierte *yvyD* Deletionsmutante JW1 von *B. subtilis* JH642 (Abschnitt 4.1.3) in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C analysiert. Nachfolgend ist die Wachstumskurve der *yvyD* Deletionsmutante im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 gezeigt.

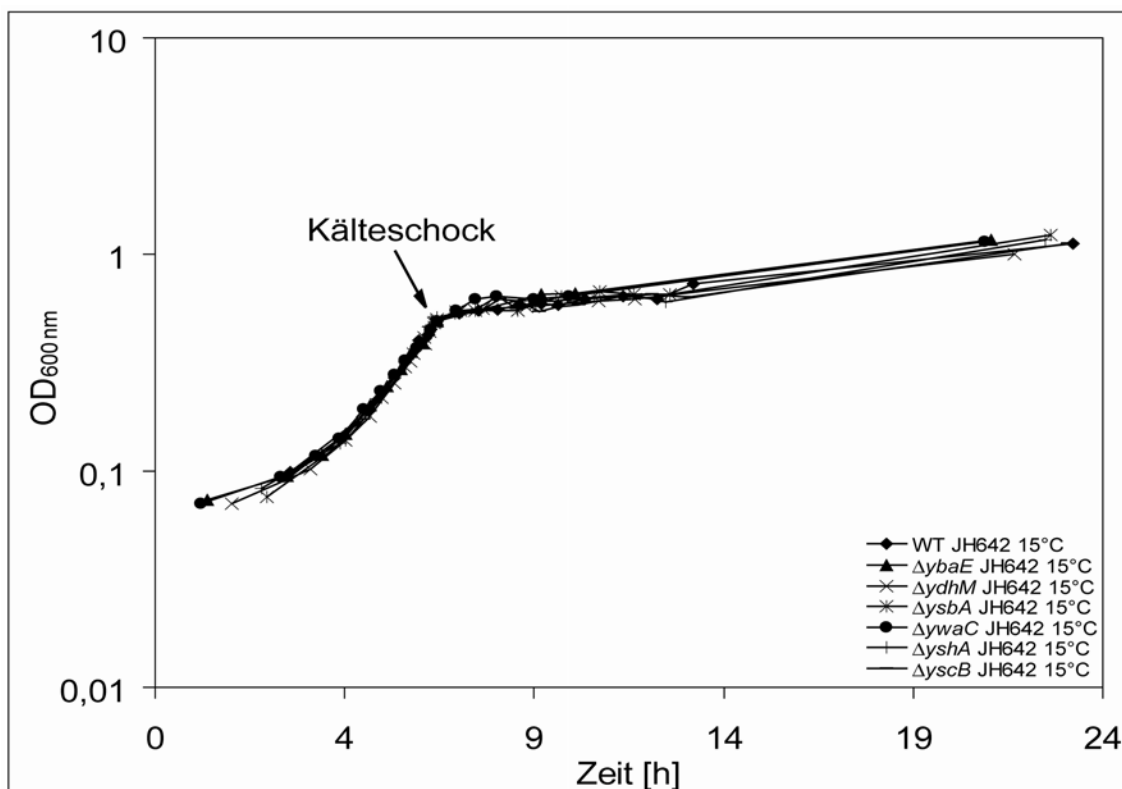


**Abb. 4.1-5:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642 und  $\Delta yvyD$  (JW1) nach einem Kälteschock

Wie anhand des Wachstumsdiagramms zu erkennen ist, zeigt die *yvyD* Deletionsmutante ein identisches Wachstumsverhalten wie der Kontrollstamm JH642 (**Abb. 4.1-5**) und scheint damit in erster Linie nicht relevant für die Kälteanpassung des *B. subtilis* zu sein.

#### 4.1.4.3 Wachstumseigenschaften der *ybaE*, *ydhM*, *ysbA*, *ywaC*, *yshA* und *yscB* Deletionsmutanten

Aufgrund der gezeigten Kälteinduktion von *ybaE* (4,1x), *ydhM* (11,9x), *ysbA* (2,7x), *ywaC* (5,8x), *yshA* (3,7x) und *yscB* (4,3) auf Transkriptionsebene, sollte die Relevanz dieser Genprodukte für die Kälteanpassung untersucht werden. Hierzu wurden die konstruierten Deletionsmutanten von *B. subtilis* JH642 (Abschnitt 4.1.3) in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C analysiert. Nachfolgend ist die Wachstumskurve der Deletionsmutanten im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 gezeigt.



**Abb. 4.1-6:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642,  $\Delta ybaE$  (FW23),  $\Delta ydhM$  (FW24),  $\Delta ysbA$  (FW25),  $\Delta ywaC$  (FW26),  $\Delta yshA$  (FW27) und  $\Delta yscB$  (FW28) nach einem Kälteschock

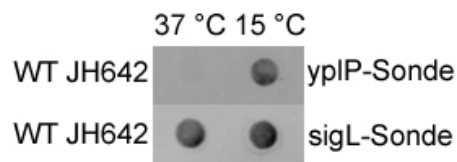
Die konstruierten Deletionsmutanten FW23 bis FW28 zeigen nach einem Kälteschock keine verschlechterten Wachstumseigenschaften im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis*

JH642 (**Abb. 4.1-6**) und scheinen damit in erster Linie nicht relevant für die Kälteanpassung des *B. subtilis* zu sein.

## 4.2 Untersuchung der kälterelevanten $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren in *Bacillus subtilis*

Aus früheren Transkriptionsanalysen von *B. subtilis* und Deletionsstudien war die Kälterelevanz des  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivators YlpP bereits bekannt (Beckering *et al.*, 2002). Er zeigt signifikante Homologie zu Transkriptionsregulatoren aus der *E. coli* NtrC/NifA Familie. In *B. subtilis* sind insgesamt fünf Homologe dieser Familie bekannt. Die fünf  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren sind AcoR, BkdR, LevR, RocR und YlpP.

In Transkriptionsstudien dieser Arbeit (Abschnitt 4.1.2) konnte die Kälteinduktion von *yplP* bestätigt und zusätzlich die Induktion von *sigL* gezeigt werden. Zur Bestätigung dieser Kälteinduktion wurde eine Northern-Dot-Blot-Analyse (Abschnitt 3.3.2) von gesamtRNA des Stammes JH642 mit Sonden gegen *yplP* und *sigL* durchgeführt. Die DNA für die Sonden wurden mit den Primerpaaren 5'-*yplP* Sonde / 3'-*yplP* Sonde+T7 und 5'-*sigL* Sonde / 3'-*sigL* Sonde+T7 amplifiziert, gereinigt und die Sonden wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben hergestellt. Nachfolgend ist der Dot-Blot von gesamtRNA des Wildtyps JH642 gegen eine *yplP*- und *sigL*-Sonde dargestellt.



**Abb. 4.2-1:** Northern-Dot-Blot von gesamtRNA des Wildtyps JH642 gegen *yplP*- und *sigL*-Sonde

Aus **Abb. 4.2-1** geht die eindeutige Kälteinduktion von *yplP* auf Transkriptionsebene hervor und deckt sich mit früheren und den Ergebnissen (10-fache Induktion) aus den DNA-Arrays dieser Arbeit. Das Gen *sigL* zeigt eine leichte Induktion nach einem Kälteschock, was mit der 2,5-fachen Induktion aus den DNA-Arrays korreliert. Diese Erkenntnisse motivierten zur Untersuchung des gesamten  $\sigma^L$ -Regulons bezüglich seiner Rolle für die Kälteschockanpassung von *B. subtilis*.

Hierzu wurden zuerst Deletionsmutanten der Transkriptionsaktivatoren und ihrem  $\sigma^L$ -Faktor konstruiert und anschließend ihre Wachstumseigenschaften untersucht. Die Erkenntnisse aus



diesen Studien sollten als Grundlage für weitere Untersuchungen in Bezug auf das Zusammenspiel der erhaltenen kälterelevanten Kandidaten durch Interaktionsstudien verwendet werden.

#### **4.2.1 Konstruktion der Deletionsmutanten aus *Bacillus subtilis***

Aufgrund des Wissens um den bisher nicht charakterisierten Defekt im Biosyntheseweg verzweigter Fettsäuren im Stamm JH642 (Klein *et al.*, 1999) wurden die nachfolgenden Untersuchungen sowohl in dem bisher immer verwendeten Laborstamm JH642 als auch im Wildtypstamm MR168 durchgeführt.

##### **4.2.1.1 Konstruktion der *acoR* Deletionsmutanten FW9 und FW13**

Die Konstruktion von FW9 und FW13 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* MR168 und JH642 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *acoR* mit einer Kanamycinkassette (*aphA3*) dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante QB7704 (Ali *et al.*, 2001) mit den Primern 5'-*acoR* und 3'-*acoR* mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *acoR* mit PCR kontrolliert.

##### **4.2.1.2 Konstruktion der *levR* Deletionsmutante FW14**

Die Konstruktion von FW14 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *levR* mit einer Kanamycinkassette (*aphA3*) dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante QB5173 (Martin-Verstraete *et al.*, 1994) mit den Primern 5'-*levR* und 3'-*levR* mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *levR* mit PCR kontrolliert.

##### **4.2.1.3 Konstruktion der *rocR* Deletionsmutante FW15**

Die Konstruktion von FW15 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *rocR* mit einer

Kanamycinkassette (*aphA3*) dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante QB5533 (Calogero *et al.*, 1994) mit den Primern 5'-*rocR* und 3'-*rocR* mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *rocR* mit PCR kontrolliert.

#### 4.2.1.4 Konstruktion der *bkdR* Deletionsmutante FW10

Die Konstruktion von FW10 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *bkdR* mit einer Kanamycinkassette (*aphA3*) dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante QB7512 (Debarbouille *et al.*, 1999) mit den Primern 5'-*bkdR* und 3'-*bkdR* mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *bkdR* mit PCR kontrolliert.

#### 4.2.1.5 Konstruktion der *sigL* Deletionsmutanten FW6

Die Konstruktion von FW6 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *sigL* mit einer Kanamycinkassette (*aphA3*) dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante QB5505 (Debarbouille *et al.*, 1991) mit den Primern *sigL*-P1 und *sigL*-P4 mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *sigL* mit PCR kontrolliert.

#### 4.2.1.6 Konstruktion der *yplP* Deletionsmutanten FW7

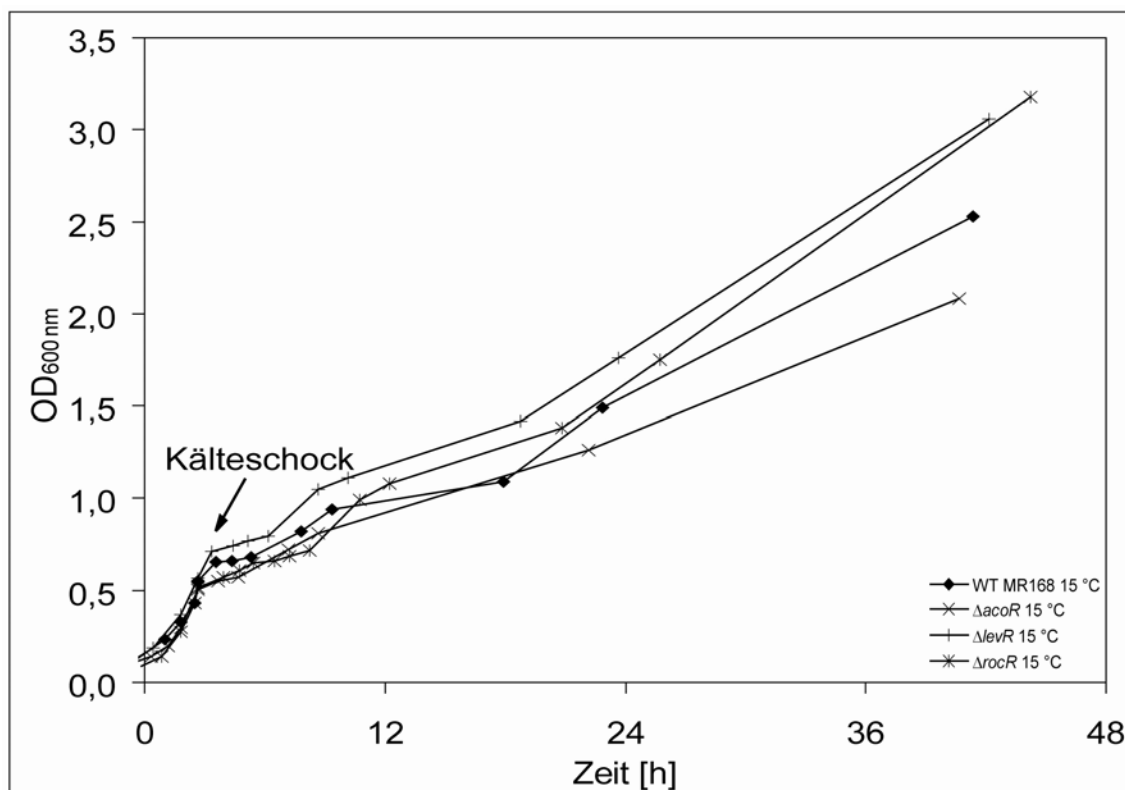
Die Konstruktion von FW7 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* MR168 mit einem DNA-Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yplP* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Dieses DNA-Fragment wurde aus der Deletionsmutante CB15 (Beckering *et al.*, 2002) mit den Primern *yplP*-455(*EcoRI*) und *yplP*+1475(*EcoRI*) mittels PCR amplifiziert und gereinigt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration des Deletionsfragments auf DSM Kan<sup>10</sup> Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yplP* mit PCR kontrolliert.

#### 4.2.2 Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten aus *Bacillus subtilis*

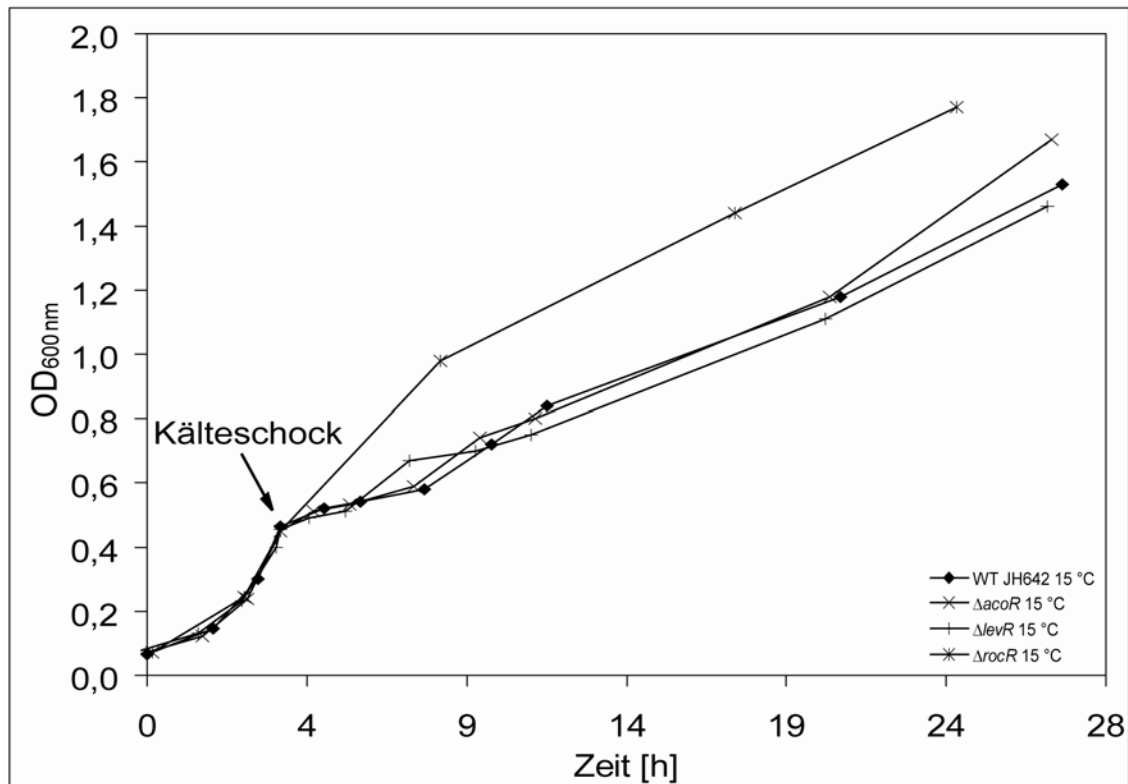
In den nachfolgenden Untersuchungen wurden die konstruierten Mutanten in ihrem Wachstum nach einem Kälteschock untersucht (Abschnitt 3.1.2). Hierzu wurden diese Mutanten entsprechend der bekannten Auxotrophien der Stämme *B. subtilis* MR168 und JH642 (Abschnitt 2.4) in SMM-Medium mit den entsprechenden Mengen an Zusätzen (Abschnitt 2.5) wachsen gelassen. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsanalysen wurden mindestens dreimal reproduziert.

##### 4.2.2.1 Wachstumseigenschaften der *acoR*, *levR* und *rocR* Deletionsmutanten

Die Kälterelevanz der Genprodukte von *acoR*, *levR* und *rocR* sollte untersucht werden. Hierzu wurden die konstruierten Deletionsmutanten der Stämme *B. subtilis* MR168 und JH642 (Abschnitt 4.2.1) in Bezug auf ihr Wachstumsverhalten nach einem Kälteschock analysiert. Nachfolgend sind die Wachstumskurven der *acoR*, *levR* und *rocR* Deletionsmutanten im Vergleich zu den Kontrollstämmen *B. subtilis* MR168 und JH642 gezeigt.



**Abb. 4.2-2:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* MR168,  $\Delta acoR$  (FW9),  $\Delta levR$  (QB5173) und  $\Delta rocR$  (QB5533) nach einem Kälteschock



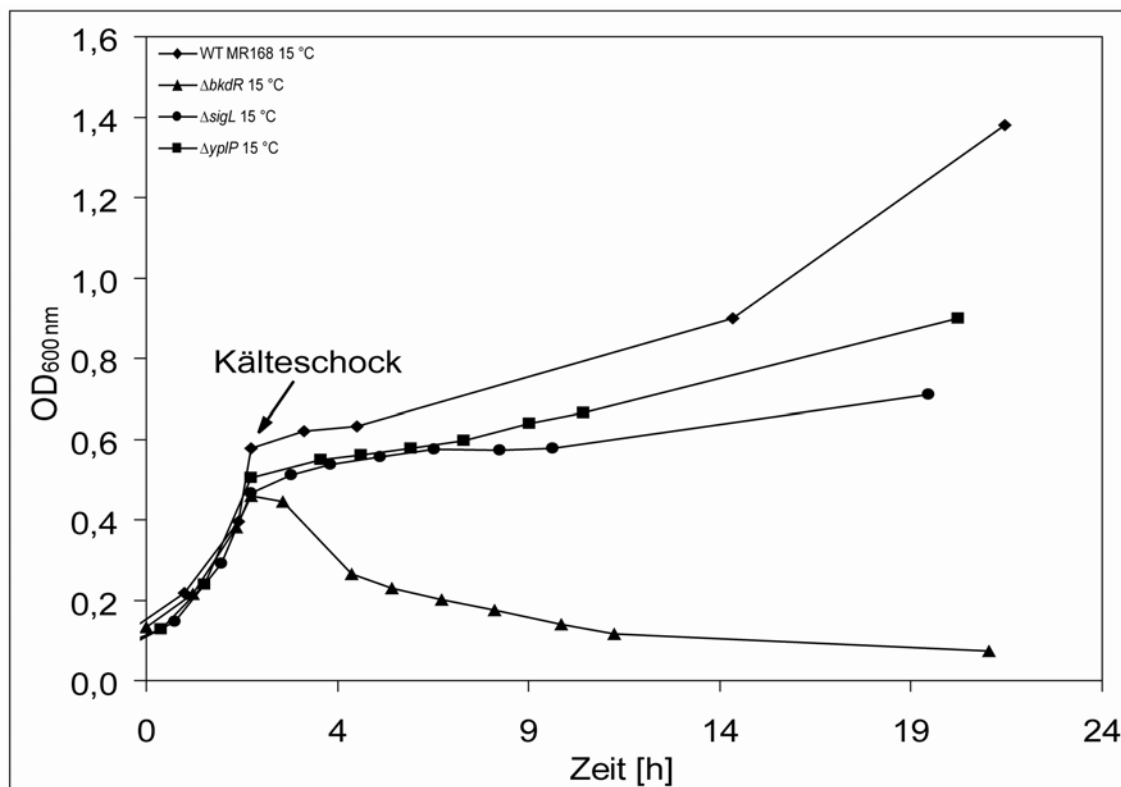
**Abb. 4.2-3:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642,  $\Delta acoR$  (FW13),  $\Delta levR$  (FW14) und  $\Delta rocR$  (FW15) nach einem Kälteschock mit Zugabe von Isoleucin zum Medium

Wie auf den beiden Wachstumsdiagrammen zu erkennen ist, zeigen die Deletionsmutanten sowohl im MR168 als auch im JH642 identische Wachstumseigenschaften im Vergleich zu den Wildtypen. Die Genprodukte von *acoR*, *levR* und *rocR* scheinen demnach keine Rolle für die Kälteanpassung von *B. subtilis* zu spielen.

#### 4.2.2.2 Wachstumseigenschaften der *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten

Um zu sehen, welche Auswirkung die Deletion der Gene *bkdR*, *sigL* und *yplP* aus *B. subtilis* auf die Kälteanpassung hat, wurden von den *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten Wachstumskurven im Vergleich zu den Kontrollstämmen *B. subtilis* MR168 und JH642 aufgenommen. Die *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten aus JH642 wurden sowohl mit als auch ohne Zusatz von Isoleucin untersucht. Dieses liegt zum einen an dem uncharakterisierten Defekt in der Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren des Stammes *B. subtilis* JH642, der nur durch Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium ausgeglichen werden kann (Klein *et al.*, 1999). Zum anderen sind die Genprodukte von *sigL* und *bkdR* an der Regulation der Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren über die Aktivierung des *bkd*-Operons beteiligt, das

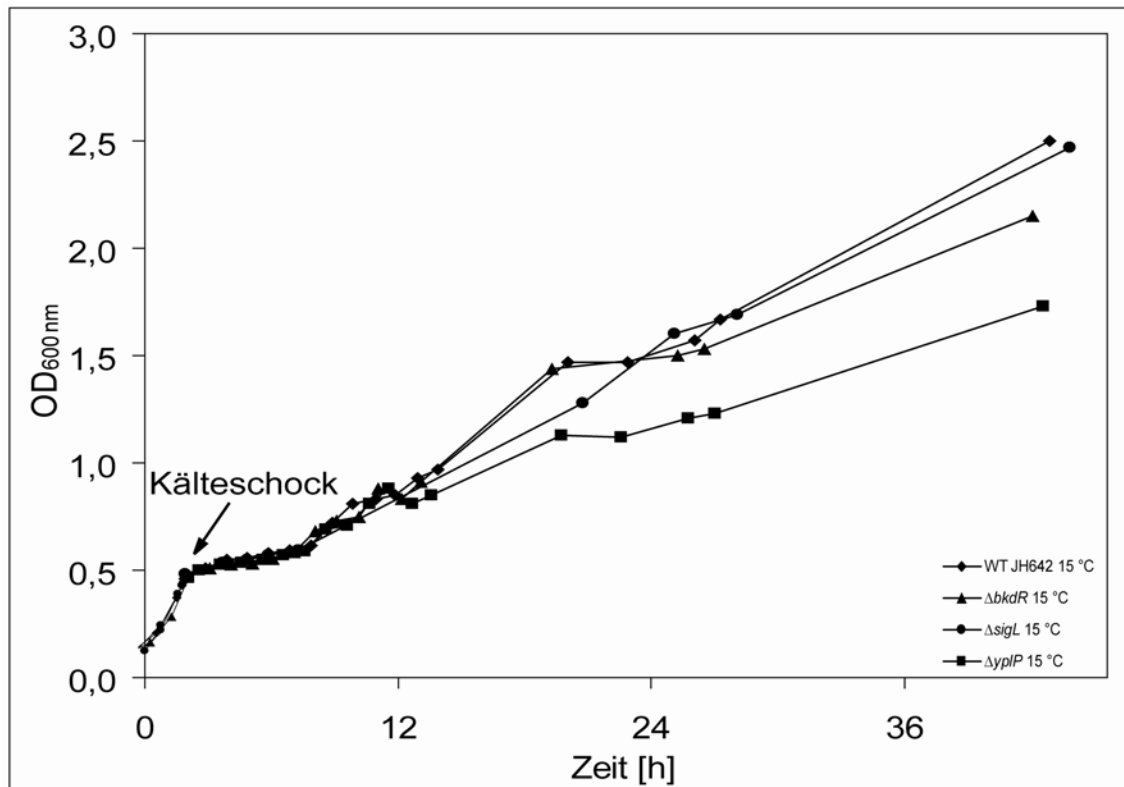
für isoleucinverwertende Enzyme kodiert. Eine ebenso mögliche Beteiligung des Genproduktes von *yplP* an der Membrananpassung lässt sich an dieser Stelle nicht ausschließen. Nachfolgend sind die Wachstumskurven der *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten im Vergleich zu den Kontrollstämmen *B. subtilis* MR168 (Abb. 4.2-4) und JH642 (Abb. 4.2-5) gezeigt.



**Abb. 4.2-4:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* MR168,  $\Delta bkdR$  (QB7512),  $\Delta sigL$  (QB5505) und  $\Delta yplP$  (FW7) nach einem Kälteschock ohne Zugabe von Isoleucin zum Medium

Die gemessenen Stämme sind Derivate vom Wildtypstamm MR168 und wurden ohne Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium untersucht. Die *bkdR* Deletionsmutante QB7512 lysiert in Abb. 4.2-4 nach einem Kälteschock im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* MR168. Die *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten QB5505 und FW7 zeigen schwächere aber eindeutige kältesensitive Phänotypen. Untereinander betrachtet wächst die *sigL* Deletionsmutante QB5505 schlechter als die *yplP* Deletionsmutante FW7.

Die beobachteten Phänotypen zeigen, dass die Genprodukte von *bkdR*, *sigL* und *yplP* des Stammes MR168 für die Kälteanpassung von *B. subtilis* relevant sind.



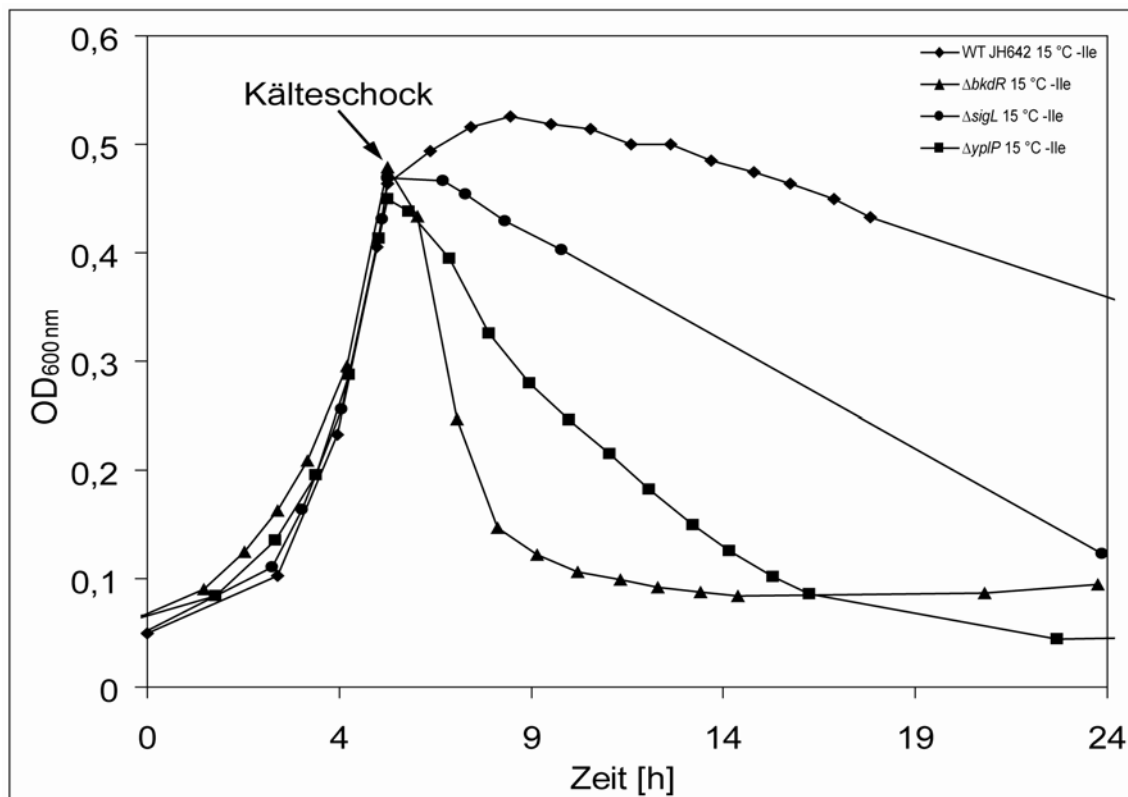
**Abb. 4.2-5:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642,  $\Delta bkdR$  (FW10),  $\Delta sigL$  (FW6) und  $\Delta yplP$  (CB15) nach einem Kälteschock mit Zugabe von Isoleucin zum Medium

Die gemessenen Stämme sind Derivate vom Wildtypstamm JH642 und wurden mit Isoleucin im Wachstumsmedium untersucht. In **Abb. 4.2-5** zeigt die *yplP* Deletionsmutante CB15 einen kältespezifischen Phänotyp im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642. Dies wurde schon in früheren Studien festgestellt (Beckering *et al.*, 2002). Die *sigL* Deletionsmutante FW6 und die *bkdR* Deletionsmutante FW10 zeigen im Wachstum nahezu keinen Unterschied zum Wildtyp JH642.

An dieser Stelle fallen die Unterschiede im Wachstum der Deletionsmutanten zwischen den Stämmen *B. subtilis* MR168 und JH642 auf. Die Vermutung war, dass es etwas mit dem bereits bekannten, aber noch nicht charakterisierten Wachstumsdefekt des Stammes JH642 zu tun haben könnte (Klein *et al.*, 1999). Diese Diversität zwischen den Wildtypstämmen MR168 und JH642 veranlasste eine eingehende stammvergleichende Untersuchung, die in Abschnitt 4.3 näher beschrieben ist.

Klein *et al.* haben gezeigt, dass der Stamm JH642 unter Kälteschockbedingungen nur durch Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium überleben kann. Aus diesem Grund wurde das letzte Wachstumsexperiment unter Weglassung des für den JH642 kälterelevanten Zusatzes Isoleucin durchgeführt. Diese Wachstumskurve der vom Stamm JH642 abgeleiteten *bkdR*,

*sigL* und *yplP* Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp JH642 ohne Zusatz von Isoleucin ist im Folgenden gezeigt.

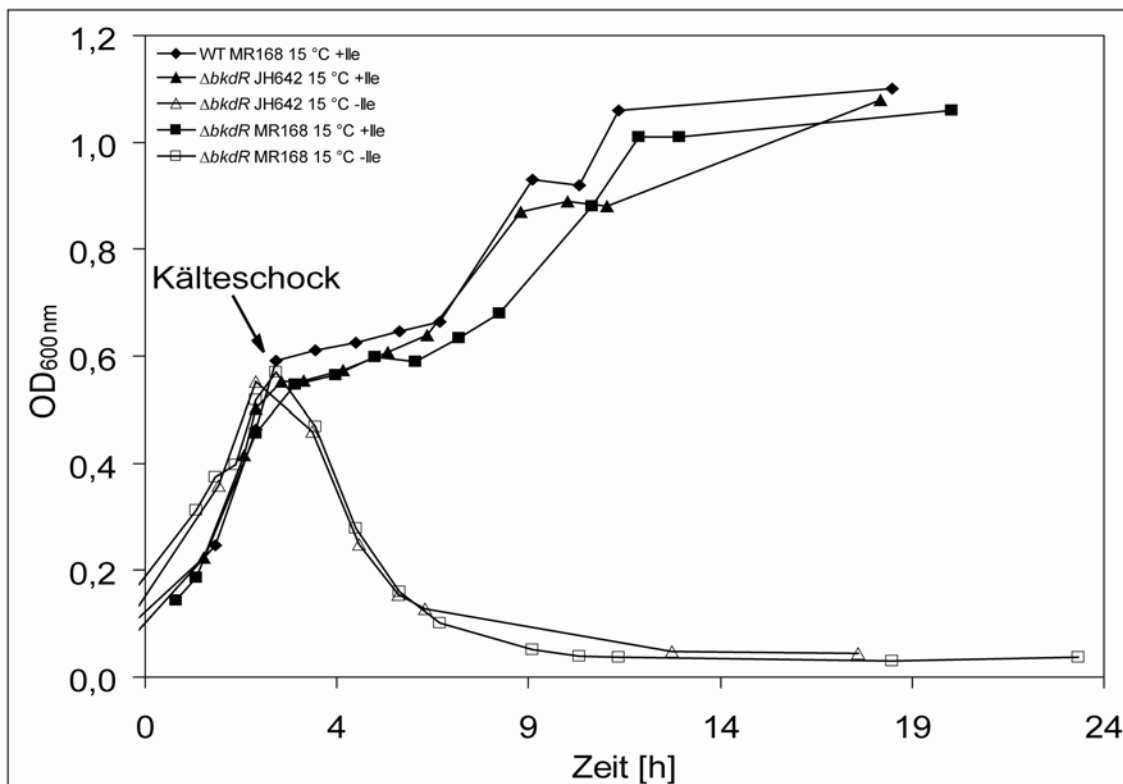


**Abb. 4.2-6:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642,  $\Delta bkdR$  (FW10),  $\Delta sigL$  (FW6) und  $\Delta yplP$  (CB15) nach einem Kälteschock ohne Zugabe von Isoleucin zum Medium

In **Abb. 4.2-6** zeigt die vom Stamm JH642 abgeleitete *bkdR* Deletionsmutante FW10 einen starken kältespezifischen Phänotyp und somit das gleiche Wachstumsverhalten wie die *bkdR* Deletionsmutante aus dem Stamm MR168. Ebenso sind die Phänotypen der vom Stamm JH642 abgeleiteten *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten sehr stark. Im Vergleich dieser beiden Phänotypen mit denen aus dem Stamm MR168 ist allerdings zu erkennen, dass das Wachstumsdefizit im JH642 viel stärker ins Gewicht fällt. Ebenso wächst die *yplP* Deletionsmutante CB15 viel schlechter als die *sigL* Deletionsmutante FW6. Dies wurde im Stamm MR168 jedoch nicht beobachtet.

Diese Wachstumsuntersuchungen zeigen eindeutig die große Relevanz der Genprodukte von *bkdR*, *sigL* und *yplP* für die Kälteanpassung von *B. subtilis*. Allerdings werfen die Unterschiede im Wachstum der Deletionsmutanten zwischen den Stämmen MR168 und JH642 weiterhin die Frage auf, wo der uncharakterisierte Defekt im JH642 lokalisiert sein könnte (Abschnitt 4.3).

Im Weiteren wird die Relevanz des Zusatzes Isoleucin für die *bkdR* Deletionsmutanten QB7512 aus MR168 und FW10 aus JH642 näher untersucht, da der Stamm JH642 bisher immer mit Zugabe von Isoleucin gemessen wurde und deshalb der Wachstumsdefekt der *bkdR* Deletionsmutante nicht entdeckt werden konnte. Es wurde aus diesem Grund eine weitere Wachstumskurve dieser beiden Deletionsmutanten mit und ohne den Zusatz von Isoleucin zum Medium aufgenommen. Als Referenzstamm diente der Stamm MR168, da dieser im Gegensatz zum JH642 keinen kältespezifischen Wachstumsdefekt nach einem Kälteschock zeigt.



**Abb. 4.2-7:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* MR168, JH642,  $\Delta bkdR$  (QB7512),  $\Delta bkdR$  (FW10) nach einem Kälteschock mit und ohne Zugabe von Isoleucin zum Medium

Aus **Abb. 4.2-7** ist deutlich zu erkennen, dass der Zusatz von Isoleucin zum Wachstumsmedium die starken Phänotypen der *bkdR* Deletionsmutanten beider Stämme auf das Wachstumsniveau des Wildtyps MR168 anheben kann. In diesem Punkt unterscheiden sich die Stämme MR168 und JH642 nicht.



### 4.2.3 Unterschiede im Wachstum der *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten

Wie aus den Wachstumsanalysen hervorging, zeigten nur die konstruierten *bkdR*, *sigL* und *yplP* Deletionsmutanten der Stämme MR168 und JH642 untereinander unterschiedliche Wachstumseigenschaften. Dieses kann verschiedene Ursachen haben. Der Unterschied kann in den Strukturgenen oder Promotoren der Gene lokalisiert sein. Es könnte sich aber auch um einen Unterschied der Stämme JH642 und MR168 handeln, der sich an einer anderen Stelle im Chromosom befindet. Um die Gene von *bkdR*, *sigL* und *yplP* auf Unterschiede zwischen den Stämmen JH642 und MR168 zu untersuchen, sollten diese sequenziert werden.

Des Weiteren musste der Phänotyp der *yplP* Deletionsmutante CB15 in Hinblick auf einen polaren Effekt durch das sich mit *yplP* in einem Operon liegende Gen *yplQ* überprüft werden. Die Phänotypen der *bkdR* und *sigL* Deletionsmutanten sind aufgrund der monocistronischen Anordnung ihrer Gene im Genom als gesichert angesehen worden.

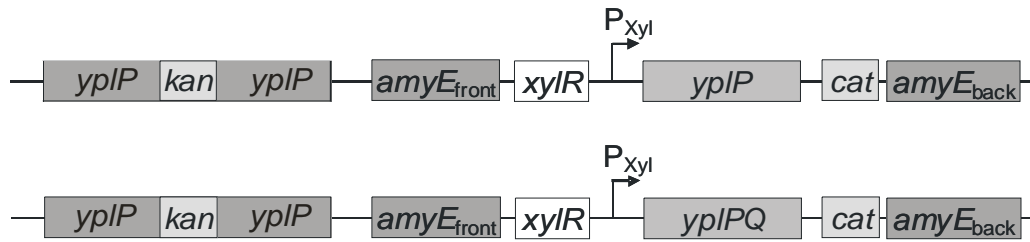
#### 4.2.3.1 Sequenzierung der deletierten Gene *bkdR*, *sigL* und *yplP*

Für die Sequenzierung der betreffenden Gene aus den Stämmen JH642 und MR168 wurden mittels PCR die Promotorregionen mit den dazugehörigen Genen amplifiziert (Abschnitt 3.2.2), gereinigt (Abschnitt 3.2.3) und in Konzentrationen von 50 ng/μL von der Firma GATC sequenziert (Sequenzierprimer Abschnitt 6.1).

Die Gene *bkdR*, *sigL* und *yplP* mit ihren Promotorregionen wiesen zwischen den Stämmen JH642 und MR168 keine Unterschiede auf. Für alle nachfolgenden Untersuchungen wurde daher der Laborstamm JH642 verwendet.

#### 4.2.3.2 Ausschluss polarer Effekte in *yplP* Deletionsmutante

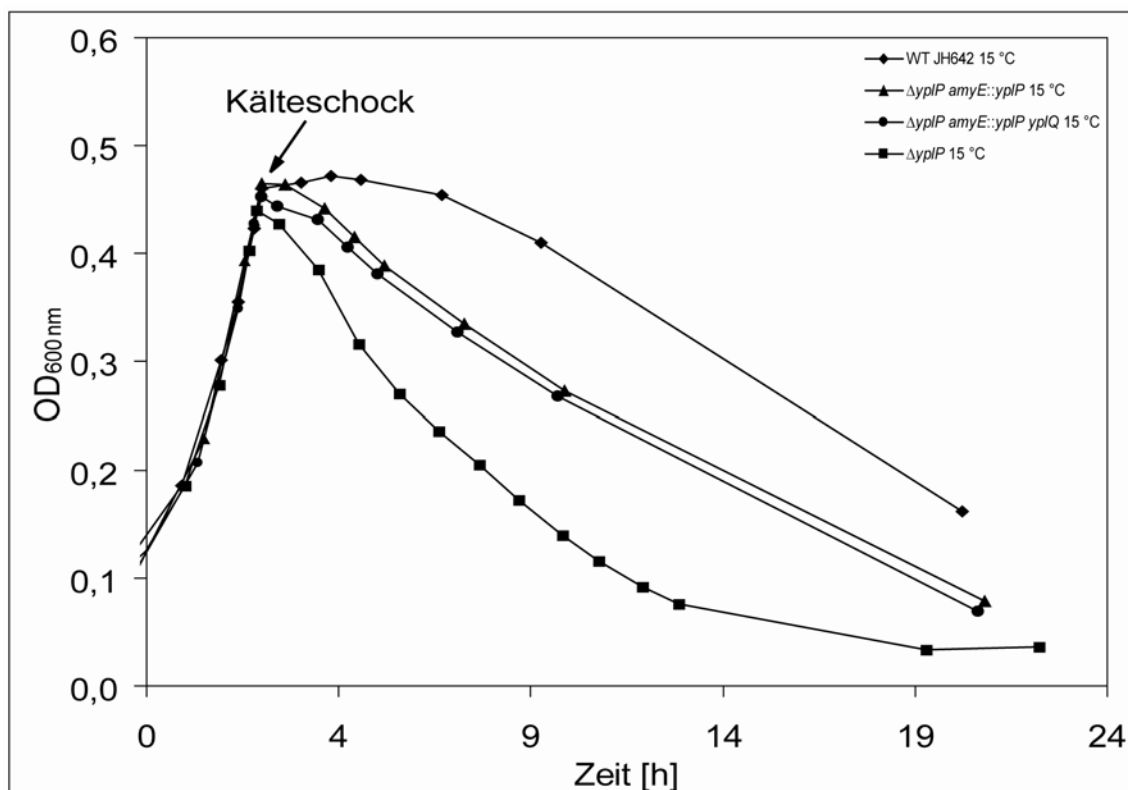
Um ausschließen zu können, dass der Phänotyp der *yplP* Deletionsmutante CB15 nicht durch einen polaren Effekt des Gens *yplQ*, das sich mit *yplP* in einem Operon befindet, zu erklären ist, wurden *in trans* Komplementationsstudien durchgeführt. Hierbei wurde *yplP* mit 5'-*yplP* (*SpeI*) und 3'-*yplP* (*BamHI*) und *yplP/yplQ* mit den Primern 5'-*yplP* (*SpeI*) und 3'-*yplQ* (*BamHI*) amplifiziert und gereinigt. Die PCR Fragmente wurden mit *SpeI* und *BamHI* verdaut und mit dem ebenso geschnittenen *B. subtilis* Integrationsvektor pX (Abschnitt 2.3.1) ligiert. Anschließend wurde *Bacillus subtilis* JH642 mit dem erhaltenen Vektor transformiert. Dies ergab die Stämme FW19 und FW20, die im Folgenden gezeigt sind (Abb. 4.2-8a).



**Abb. 4.2-8a:** Komplementationsstämme  $\Delta ylp$  *amyE::yplP* (FW19) und  $\Delta ylp$  *amyE::yplPQ* (FW20)

Die erhaltenen Komplementationsstämme FW19 und FW20 wurden Wachstumsanalysen im Vergleich zum Wildtyp JH642 unterzogen (Abschnitt 3.1.2). Sie wurden in SMM-Medium mit den Zusätzen Tryptophan, Phenylalanin, Spurenelementen und Fruktose untersucht (Abschnitt 2.5). Wie aus den vorherigen Wachstumsstudien zu erkennen war, ist der Effekt der *yplP* Deletion durch das Weglassen des Zusatzes Isoleucin besser zu beobachten. Für diese Untersuchung wurde deshalb ebenfalls auf den Zusatz von Isoleucin zum Medium verzichtet. Zur Induktion der *in trans* in das *amyE* Gen integrierten Gene wurde 0,5 % Xylose zum Zeitpunkt des Kälteschocks zugesetzt.

Nachfolgend ist die Wachstumskurve des Wildtyps JH642, der *yplP* Deletionsmutante CB15 und der zwei Komplementationsstämme FW19 und FW20 nach einem Kälteschock gezeigt.



**Abb. 4.2-8b:** Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* JH642,  $\Delta ylp$  (CB15),  $\Delta ylp$  *amyE::yplP* (FW19) und  $\Delta ylp$  *amyE::yplPQ* (FW20) nach einem Kälteschock ohne Zugabe von Isoleucin

Der Wachstumsdefekt der *yplP* Deletionsmutante CB15 im Vergleich zum Wildtyp JH642 ist wie im Abschnitt 4.2.2.2 deutlich zu erkennen. Die Integration der Gene *yplP* und *yplQ* mit *yplQ* zusammen zeigt ein deutlich besseres Wachstum der Stämme FW19 und FW20 im Vergleich zur *yplP* Deletionsmutante CB15. Sie erreicht aber nicht die Wachstumsraten des Wildtyps JH642. Untereinander verhalten sich die Stämme FW19 und FW20 in ihren Wachstumseigenschaften allerdings konsistent. Es gibt durch die zusätzliche Integration des Gens *yplQ* im Stamm FW20 kein verbessertes Wachstumsverhalten als das des Stammes FW19, in dem nur *yplP* integriert ist. Somit lässt sich ein polarer Effekt für die *yplP* Deletionsmutante CB15 ausschließen.

#### 4.2.4 Untersuchung des $\sigma^L$ -Regulons mit den Aktivatoren BkdR und YplP

Aus den vorangegangenen Experimenten wurde die Relevanz des  $\sigma^L$ -Faktors und der zwei Transkriptionsaktivatoren BkdR und YplP für die Kälteanpassung von *B. subtilis* nachgewiesen. BkdR aktiviert mit SigL zusammen die Transkription des *bkd*-Operons, welches sieben Gene beinhaltet (*ptb*, *bcd*, *buk*, *lpdV*, *bkdAA*, *bkdAB*, *bkdB*). Die sieben Gene sind an der Umsetzung von Isoleucin zu  $\alpha$ -Ketosäuren beteiligt, die als Substrate für die *de novo* Synthese von verzweigtkettigen Fettsäuren dienen. Der Aktivator YplP zeigt eine große Sequenzhomologie zu den  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren (Beckerling *et al.*, 2002) und scheint mit SigL zusammen Gene zu aktivieren, die noch nicht bekannt sind. Diese sollten im Weiteren identifiziert werden.

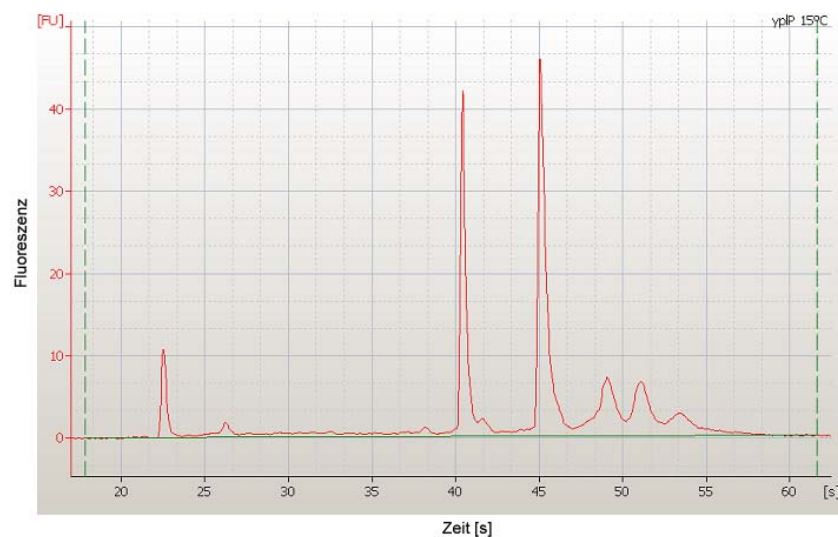
##### 4.2.4.1 Strategie zur Identifizierung von SigL und YplP regulierten Genen

Für die Identifizierung eines unbekannten Regulons ist es erforderlich die Aktivierung aller Gene im Chromosom in An- und Abwesenheit des Regulators zu untersuchen. Eine solche Analyse ist mit Hilfe der genomweiten Transkriptionsanalyse durch DNA-Arrays möglich. Durch den Vergleich der nach Kälteschock transkribierten Gene von *B. subtilis* JH642 und der *yplP* Deletionsmutante CB15 sollten die durch den  $\sigma^L$ -Faktor und YplP regulierten Gene identifiziert werden. Des Weiteren können durch eine  $\sigma^L$ -Motivsuche mit dem  $\sigma^L$ -Promotor gegen das Chromosom weitere Kandidaten bzw. Gene gefunden werden. Diese identifizierten Gene sollten anschließend mit Hilfe von Gelshiftexperimenten (EMSA) näher untersucht werden, um eine Interaktion zwischen YplP und der Ziel-DNA nachzuweisen. Dazu muss zuerst ein „Mastersystem“ mit dem Aktivator BkdR und SigL mit der bekannten Ziel-DNA

(*bkd*-Operon) etabliert werden. Dieses kann dann auf YplP und SigL mit der gefundenen putativen Ziel-DNA übertragen werden.

#### 4.2.4.2 Genomweite Transkriptionsanalyse der *yplP* Deletionsmutante CB15 im Vergleich zum WT JH642

Für die genomweite Transkriptionsanalyse der *yplP* Deletionsmutante CB15 wurden Kulturproben von CB15 und von *B. subtilis* JH642 bei 37 °C und 15 °C entnommen, aus beiden Stämmen gesamtRNA isoliert und gereinigt (Abschnitt 3.3.1). Zur Bestimmung der Qualität, der aus den Kulturproben für die DNA-Arrays präparierten gesamtRNA, wurde eine Kapillarelektrophorese durchgeführt (wie Abschnitt 4.1.4).

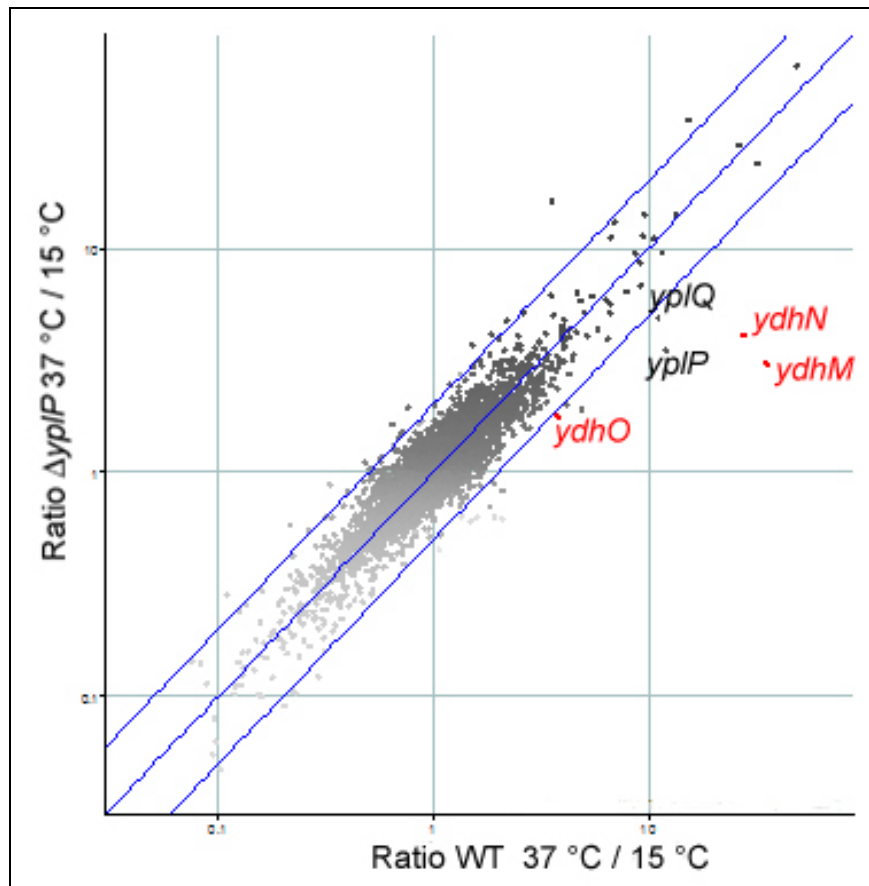


**Abb. 4.2-9:** Kapillarelektrophorese zur Qualitätskontrolle der mRNA

Bei der Kapillarelektrophorese einer intakten RNA-Probe sind deutlich zwei prominente Peaks der 16S und der 23S RNA zu erkennen (**Abb. 4.2-9**). Das Verhältnis der Fläche der beiden Peaks gibt Aufschluss über die Qualität bzw. die Degradation der RNA. Der Idealfall wäre ein Verhältnis von 1:2. In diesem Fall liegt es bei 1:1,5 und die RNA hatte demnach eine gute Qualität für die nachfolgende Transkriptionsanalyse.

Die mRNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und fluoreszenzmarkiert (Abschnitt 3.3.3.2). Diese markierte cDNA wurde dann mit den DNA-Array slides mit *B. subtilis* Genen hybridisiert (Abschnitt 3.3.3.4) und die Signale auf den DNA-Arrays anschließend mit einem Fluoreszenzscanner detektiert. Dieser Vorgang wurde für jeweils drei unabhängige Proben wiederholt, so dass für die computergestützte Auswertung drei Parallelen genutzt wurden, um die Ergebnisse statistisch zu sichern. Die

Daten wurden mit der ScanArray Express Software auf Kälteinduktionsunterschiede zwischen der *yplP* Deletionsmutante und dem Wildtypstamm JH642 hin ausgewertet (**Abb. 4.2-10**).



**Abb. 4.2-10:** Scatter-Blot der DNA-Arrayanalyse des YplP Regulons

Aufragung der Induktions- und Repressionsverhältnisse vom *B. subtilis* WT JH642 und der *ΔyplP* Deletionsmutante CB15

(Die zwei Parallelen zur Mitteldiagonale zeigen zweifache Induktion bzw. Repression an.)

Durch den Scatter-Blot in **Abb. 4.2-10** wird deutlich, dass in CB15 die Transkription von nur drei Genen durch die Deletion von *yplP* nicht mehr kälteinduziert ist. Diese Gene sind *ydhM*, *ydhN* und *ydhO* und sind in einem Operon lokalisiert. Dieses Operon wurde für die weiteren Interaktionsstudien zwischen YplP und putativer Ziel-DNA verwendet.

#### 4.2.4.3 Suche nach $\sigma^L$ -Promotoren im Chromosom von *Bacillus subtilis*

Für die nachfolgenden DNA-Protein-Interaktionsstudien zwischen dem  $\sigma^L$ -Faktor, einem Transkriptionsaktivator und der zu aktivierenden Gensequenz ist für die Bindung von  $\sigma^L$  an diese *target*-DNA das Vorhandensein der  $\sigma^L$ -Promotorsequenz notwendig. Es wurden aus

diesem Grund für die Interaktionsstudien auch die bekannten  $\sigma^L$ -Promotoren der anderen nicht kälterelevanten Transkriptionsaktivatoren für die späteren Interaktionsstudien herangezogen. Um noch weitere Kandidaten für die Untersuchung zu erhalten, wurde eine  $\sigma^L$ -Promotorensuche im Chromosom von *B. subtilis* durchgeführt. Des Weiteren wurde die DNA-Sequenz des *ydhMNO*-Operons nach einem  $\sigma^L$ -Promotor durchsucht. Nachfolgend ist ein Alignment der  $\sigma^L$ -Promotorsequenz (Konsensussequenz aus allen bekannten  $\sigma^L$ -Promotoren (Helmann und Moran, 2002)) gegen die Ergebnisse aus den DNA-Arrays (*ydhMNO*) und der chromosomenweiten Suche dargestellt (**Abb. 4.2-11**).

$\sigma^L$ -Promotor	T	G	G	C	A	X	X	X	X	X	C	T	T	G	C	A	T
<i>ydhMNO</i>	T	A	T	A	A	X	X	X	X	X	A	A	T	G	T	A	A
<i>yfmN</i>	T	G	G	G	A	X	X	X	X	X	C	T	T	G	C	A	G
<i>yhaG</i>	T	G	G	T	A	X	X	X	X	X	T	T	T	G	C	A	T
<i>ispA</i>	A	G	G	C	A	X	X	X	X	X	C	T	T	G	A	A	T
<i>ykpC</i>	C	G	G	C	A	X	X	X	X	X	C	T	T	G	C	T	T
<i>argS</i>	T	C	G	C	A	X	X	X	X	X	C	A	T	G	C	A	T

**Abb. 4.2-11:** Sequenz-Alignment möglicher  $\sigma^L$ -Promotoren

Aus dem Alignment gehen folgende Kandidaten für die späteren Interaktionsassays hervor: Diese sind das *ydhMNO*-Operon, das allerdings eine  $\sigma^L$ -Promotorsequenz mit sieben Abweichungen aufweist, die bereits bekannten  $\sigma^L$ -Promotoren von *acoA*, *rocA*, *levD*, *rocD*, *ptb* und die  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotoren von *yfmN*, *yhaG*, *ispA*, *ykpC*, *argS*. Letztere weisen zwei Abweichungen im Vergleich zur  $\sigma^L$ -Promotorsequenz auf.

#### 4.2.4.4 Klonierung, Expression und Reinigung von BkdR, SigL und YplP

Für die folgenden DNA-Protein-Interaktionsstudien von BkdR, SigL und YplP mit den oben gefundenen Ziel-DNA-Sequenzen wurden zunächst die Gene *bkdR*, *sigL* und *yplP* aus *B. subtilis* in den Expressionsvektor pNKH1 (Abschnitt 2.3.3) kloniert, die rekombinanten Proteine heterolog in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 3.4.1). Im Folgenden ist die Konstruktion der Expressionsplasmide beschrieben:

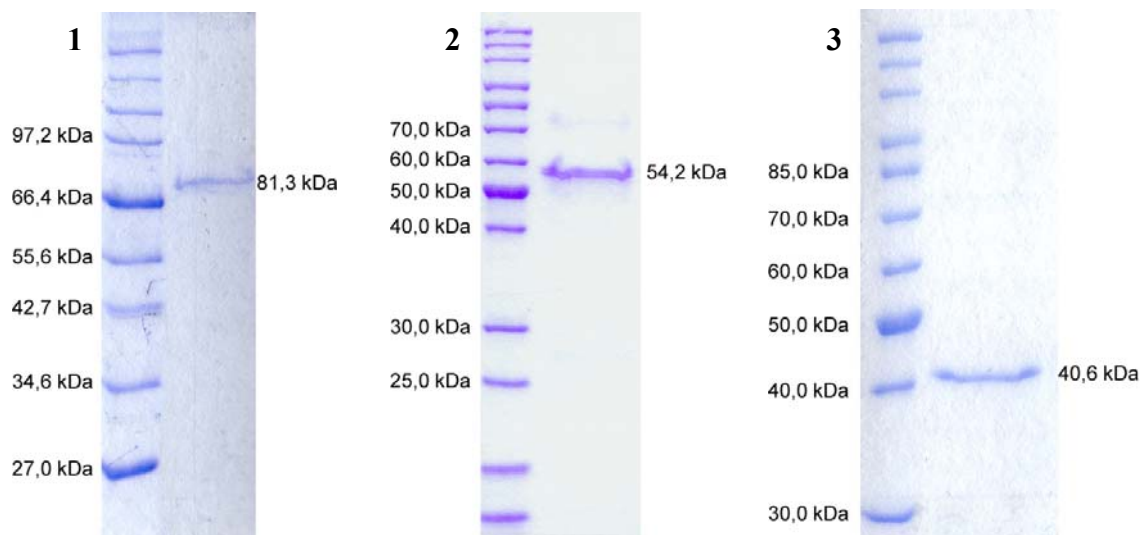
**Konstruktion von FW-Exp1 (pNKH1 mit *bkdR*):** Der für BkdR kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*bkdR* (*NcoI*) und 3'-*bkdR* (*SpeI*) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *NcoI* und *SpeI* verdaut worden war, wurde es in einen mit *NcoI* und *SpeI* geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet

ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

**Konstruktion von FW-Exp2 (pNKH1 mit *sigL*):** Der für SigL kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*sigL2* (*NcoI*) und 3'-*sigL* (*SpeI*) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *NcoI* und *SpeI* verdaut worden war, wurde es in einen mit *NcoI* und *SpeI* geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

**Konstruktion von FW-Exp3 (pNKH1 mit *ypIP*):** Der für YpIP kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*ypIP* (*NcoI*) und 3'-*ypIP* (*SpeI*) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *NcoI* und *SpeI* verdaut worden war, wurde es in einen mit *NcoI* und *SpeI* geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

Nachdem die konstruierten Expressionsplasmide vollständig sequenziert waren, wurden die rekombinanten Proteine überproduziert und nach Ni-NTA-Reinigung mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit und richtige Größe hin kontrolliert.



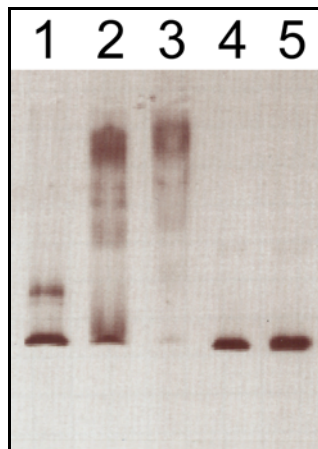
**Abb. 4.2-12:** SDS-PAGE (10 %iges Gel) von BkdR (1), SigL (2) und YpIP (3)

Die produzierten Proteine zeigten die richtigen Größen (BkdR 81,3 kDa, SigL 54,2 kDa, YpIP 40,6 kDa) und wurden zusätzlich noch durch einen tryptischen Verdau mit nachfolgender

massenspektrometrischer Identifizierung überprüft (Abschnitt 3.4.2.15). Hierbei konnten die Proteine BkdR, SigL und YplP eindeutig nachgewiesen werden.

#### 4.2.4.5 DNA-Protein-Interaktionsstudien der von BkdR und YplP regulierten Gene

Die unter 4.2.4.4 beschriebenen produzierten und gereinigten Proteine sollten nun in einem DNA-Protein-Interaktionsassay oder *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA Abschnitt 3.4.3.1) analysiert werden. Als erstes wurde die Interaktion zwischen SigL, BkdR und der *ptb*-Promotor-DNA untersucht, um eine Positivkontrolle zu erhalten, da bereits bekannt war, dass BkdR die Transkription des *bkd*-Operons (*ptb*-Promotor-DNA) aktiviert (Debarbouille *et al.*, 1999). Hierfür wurden BkdR, SigL und die *ptb*-DNA wie unter 3.4.3.1 beschrieben zusammengegeben, inkubiert und über ein natives 5 %iges Acrylamidgel getrennt. Nachfolgend ist der EMSA der *ptb*-DNA mit den einzelnen Proteinen und einem Gemisch dieser Proteine gezeigt. Die *ptb*-DNA wurde mit den Primern 5'-*ptb*\_shift und 3'-*ptb*\_shift aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert.



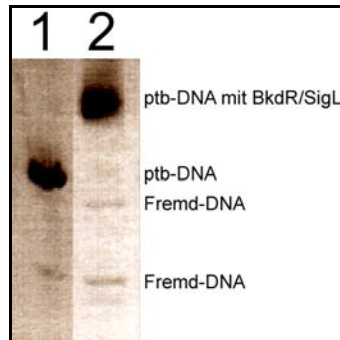
**Abb. 4.2-13:** EMSA mit BkdR, SigL und *ptb*-Promotor-DNA

- 1 → 36,9 pmol SigL
- 2 → 24,6 pmol BkdR
- 3 → 36,9 pmol SigL/24,6 pmol BkdR
- 4 → *ptb*-DNA mit denaturiertem Protein
- 5 → *ptb*-DNA mit BSA
- 1-5 → 1 pmol *ptb*-DNA

In allen fünf Spuren des Gels befanden sich 1 pmol *ptb*-Promotor-DNA. In Spur 1 ist ein deutlicher aber nicht vollständiger „step-shift“ der *ptb*-DNA durch SigL zu erkennen. In Spur 2 ist ebenfalls ein nicht ganz vollständiger Shift der *ptb*-DNA durch BkdR zu sehen. In Spur 3 ist durch das Gemisch von beiden Proteinen ein vollständiger Shift der DNA zu beobachten.



Als Kontrolle wurde in Spur 4 die *ptb*-DNA mit denaturiertem Protein und in Spur 5 *ptb*-DNA mit BSA aufgetragen. Es ist kein Shift in den Kontrollexperimenten zu sehen. In einem weiteren Kontrollexperiment wurde Fremd-DNA der *ptb*-DNA zugegeben und mit BkdR und SigL zu shiften versucht.

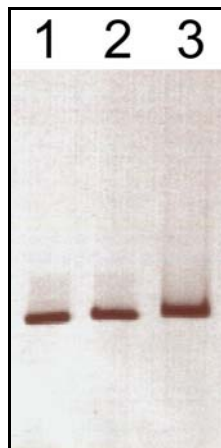


**Abb. 4.2-14:** EMSA mit BkdR, SigL und Fremd-DNA

- 1 → *ptb*-DNA ohne Protein
- 2 → 36,9 pmol SigL/24,6 pmol BkdR

In Spur 1 wurde die *ptb*-DNA mit Fremd-DNA zusammen ohne Protein aufgetragen. In Spur 2 ist eindeutig zu erkennen, dass nur die *ptb*-DNA und nicht die zwei Fremd-DNA-Banden geshiftet werden. Somit interagieren BkdR und SigL ausschließlich mit der Promotor-DNA (*ptb*-DNA) des *bkd*-Operons.

Im nächsten Schritt wurde das etablierte System auf die Proteine SigL und YlpP mit den zuvor identifizierten Target-DNA-Kandidaten übertragen und ein EMSA durchgeführt. Zunächst wurde die aus den DNA-Arrays erhaltene *ydhMNO*-Promotor-DNA untersucht (**Abb. 4.2-15**).

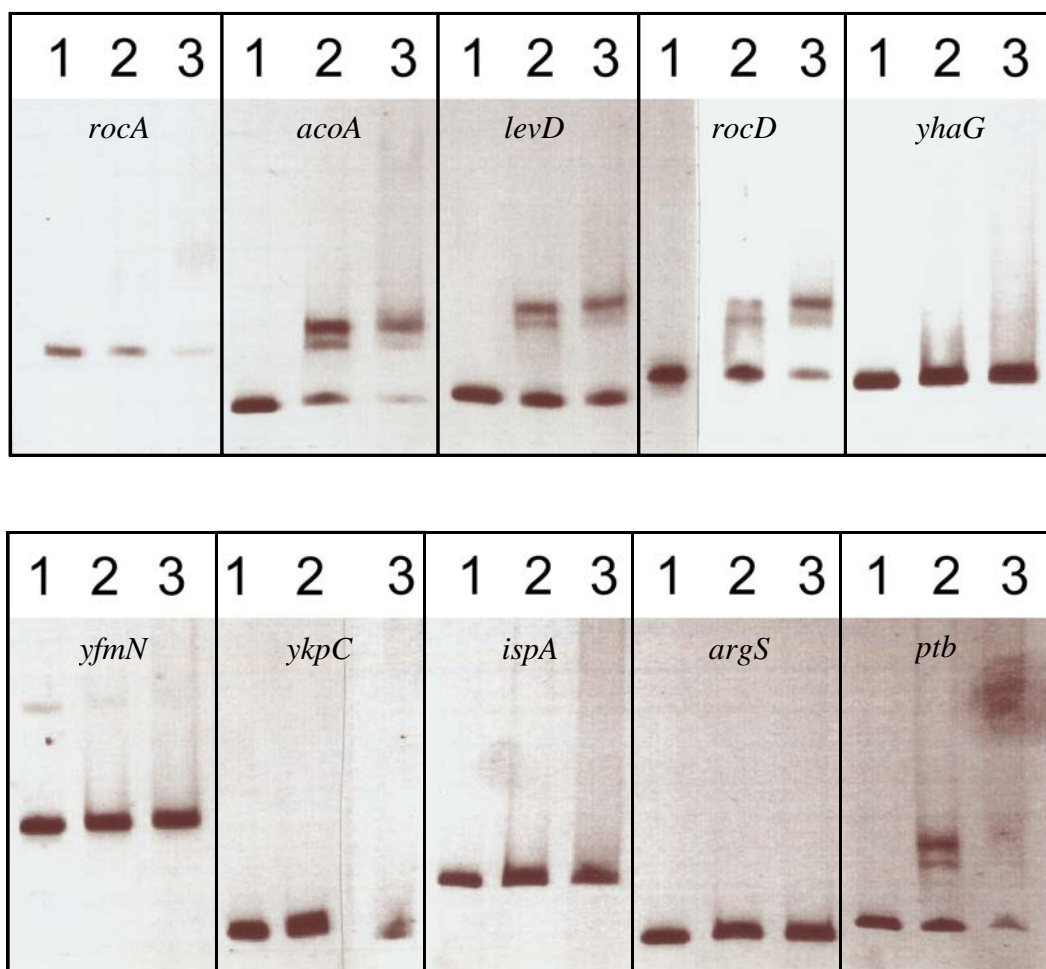


**Abb. 4.2-15:** EMSA mit SigL, YlpP und *ydhMNO*-Promotor-DNA

- 1 → *ydhMNO*-Promotor-DNA ohne Protein
- 2 → 73,98 pmol YlpP
- 3 → 55,36 pmol SigL/73,98 pmol YlpP

Die Kontrolle aus 1 pmol *ydhMNO*-Promotor-DNA ohne Protein wurde in Spur 1 aufgetragen. In Spur 2 ist kein Shift der DNA durch YpLP zu beobachten. In Spur 3 wurde ein Gemisch aus SigL und YpLP mit der *ydhMNO*-DNA aufgetragen. Auch hier ist kein Shift der DNA zu erkennen. Das *ydhMNO*-Operon scheint demnach nicht von SigL und YpLP reguliert zu werden.

Als nächstes wurden die  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen von *acoA*, *rocA*, *levD*, *rocD*, *ptb*, *yfmN*, *yhaG*, *ispA*, *ykpC*, *argS* mit SigL in einem EMSA analysiert (**Abb. 4.2-16**).



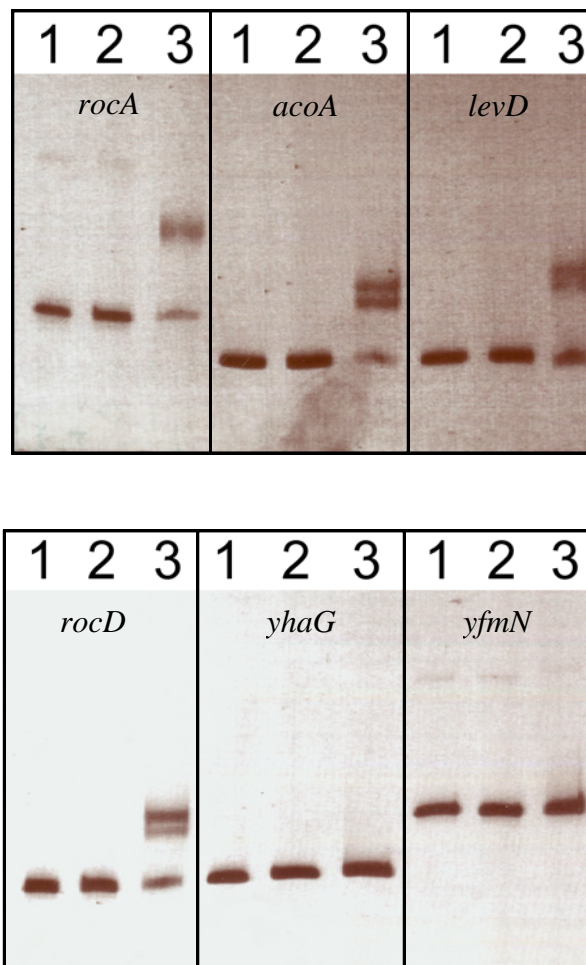
**Abb. 4.2-16:** EMSA mit SigL und den  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen

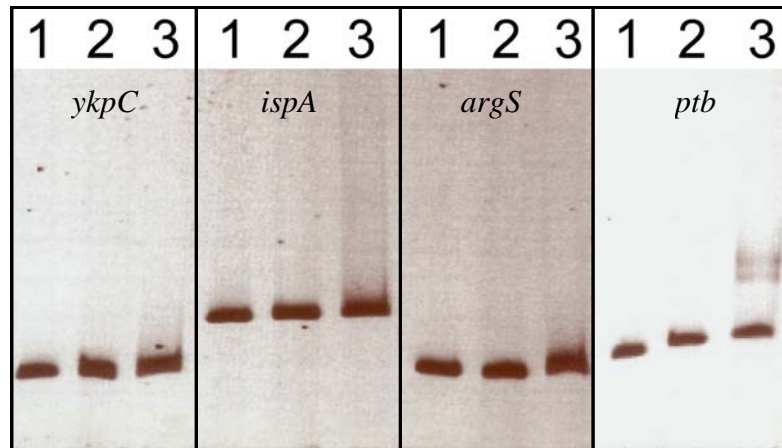
- 1 → entsprechende Promotor-DNA ohne Protein
- 2 → 55,36 pmol SigL
- 3 → 110,72 pmol SigL

In allen Spuren wurden jeweils 1 pmol DNA der einzelnen Gen-Promotoren aufgetragen. Die Spur 1 der jeweiligen Gele zeigt die DNA ohne Protein. In den Spuren 2 und 3 wurden

unterschiedliche Konzentrationen von SigL mit der DNA verwendet. Die Spur 2 enthielt 55,36 pmol und die Spur 3 110,72 pmol SigL. Für die original  $\sigma^L$ -Promotorsequenzen (*rocA*, *acoA*, *levD*, *rocD*, *ptb*) konnte der bereits erwähnte „step-shift“ von SigL beobachtet werden. Die  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen (*yhaG*, *yfmN*, *ykpC*, *ispA*, *argS*) wurden allerdings nicht von SigL geshiftet werden.

Um zu sehen, ob die Zugabe von YlpP bei den  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen einen Shift auslöst, wurde mit SigL und YlpP zusammen ein weiterer EMSA durchgeführt.





**Abb. 4.2-17:** EMSA mit SigL, YpIP und den  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen

- 1 → entsprechende Promotor-DNA ohne Protein
- 2 → 73,98 pmol YpIP
- 3 → 55,36 pmol SigL/73,98 pmol YpIP

In allen Spuren wurden wieder jeweils 1 pmol DNA der einzelnen Gen-Promotoren aufgetragen. Die Spuren 1 der einzelnen Gene zeigt die DNA ohne Protein. In den Spuren 2 wurde YpIP mit der Promotorsequenz-DNA inkubiert und in den Spuren 3 wurden SigL und YpIP zusammen mit der DNA verwendet. Für die  $\sigma^L$ -Promotorsequenzen (*rocA*, *acoA*, *levD*, *rocD*, *ptb*) konnte nur in den Spuren 3 der „step-shift“ durch SigL beobachtet werden. YpIP verursacht weder alleine (Spuren 2) noch mit SigL zusammen (Spuren 3) einen Shift der DNA-Sequenzen im EMSA. Die  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotorsequenzen (*yhaG*, *yfmN*, *ykpC*, *ispA*, *argS*) wurden ebenfalls nicht von YpIP geshiftet. Die Kombination mit SigL zeigte wie im vorangegangenen EMSA durch SigL alleine keinen Shift. Somit kann YpIP in keinem der durchgeführten Experimente die putative Target-DNA shiften. Dies kann zum einen daran liegen, dass es noch andere bis jetzt nicht identifizierte Target-DNA gibt. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass YpIP kein DNA-Bindeprotein ist. Damit lässt sich schlussfolgern, dass die Deletion von *yplP* zwar einen Wachstumsdefekt nach einem Kälteschock verursacht, jedoch die Ursachen dafür nicht durch die Interaktionsstudien und DNA-Array-Experimente geklärt werden konnten. Es ist also weiterhin unklar, welche Funktion YpIP für die Kälteanpassung von *B. subtilis* hat.

### 4.3 Untersuchung der *Bacillus subtilis* MR168 und JH642 Stämme

In früheren Studien von Klein *et al.* wurde festgestellt, dass der *B. subtilis* Wildtypstamm JH642 im Vergleich zum Wildtypstamm MR168 nach einem Kälteschock von 37 °C auf 15 °C einen Wachstumsdefekt aufweist. Er beginnt fünf bis sieben Stunden nach Kälteschock zu lysieren, während der MR168 weiterhin fähig ist unter 15 °C-Bedingungen zu wachsen (Abb. 4.3-1).

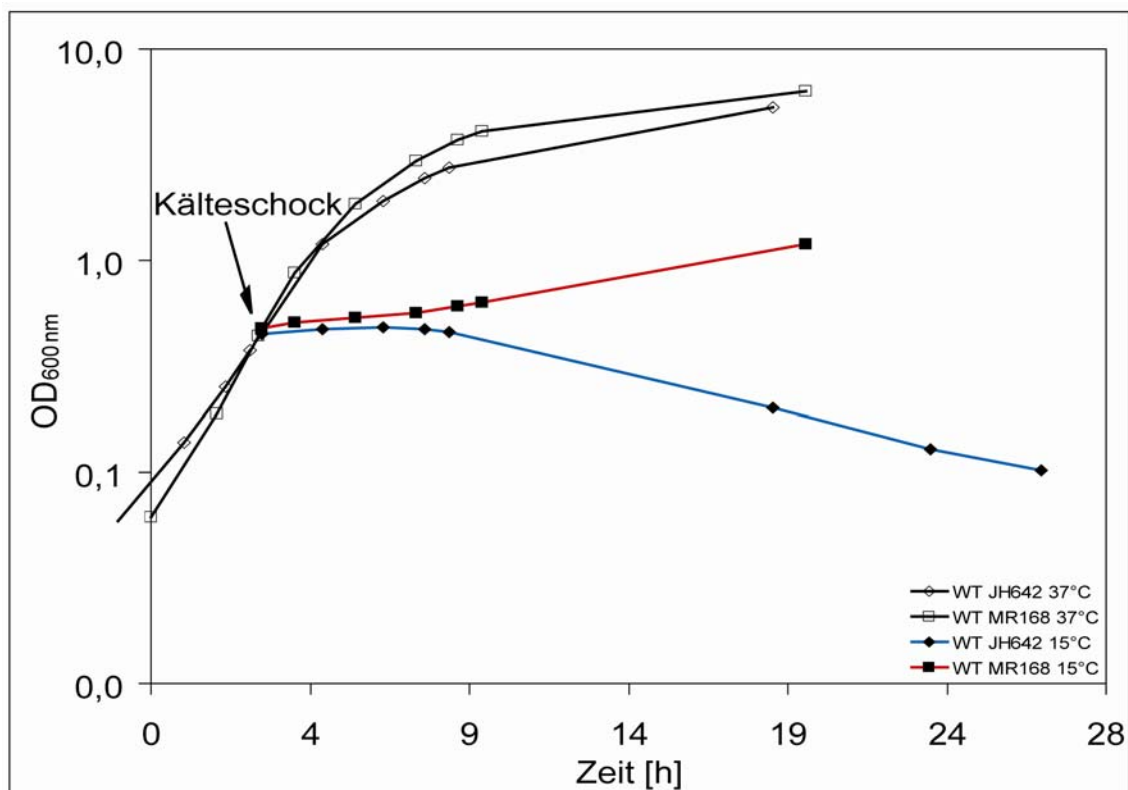
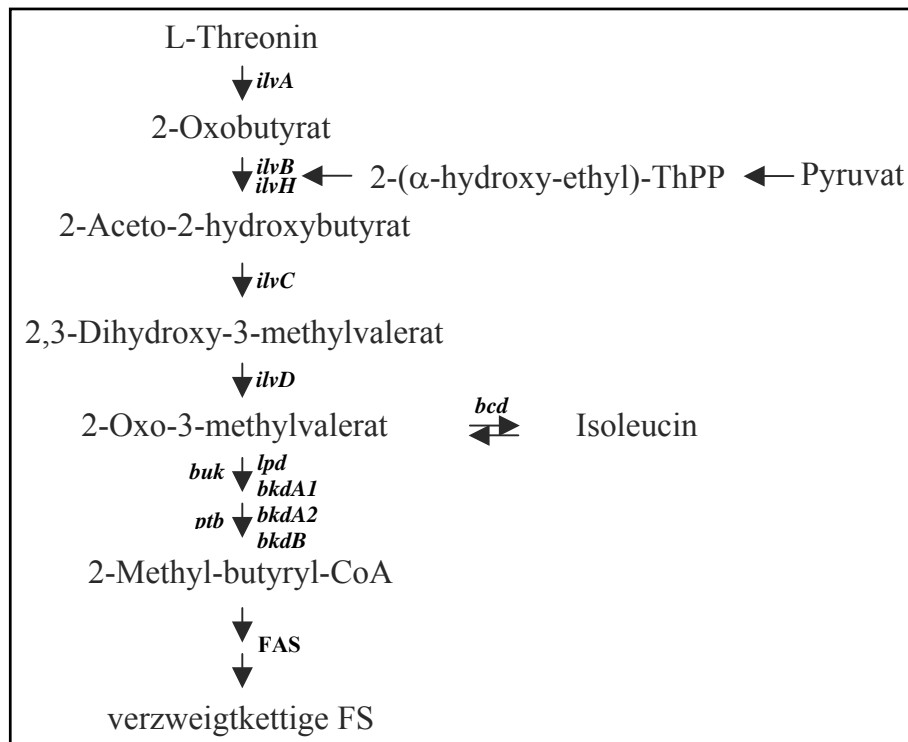


Abb. 4.3-1: Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* MR168 und JH642 bei 37 °C und 15 °C

In weiteren Untersuchungen konnte der Wachstumsdefekt des JH642 bei niedrigen Temperaturen durch die Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium aufgehoben werden. Auch die Zugabe von Zwischenprodukten des Biosyntheseweges über Isoleucin zu den anteiso-verzweigten Fettsäuren konnte den Wachstumsdefekt aufheben (Klein *et al.*, 1999). Somit sind sowohl Isoleucin als auch die Zwischenprodukte des Biosyntheseweges anteiso-verzweigter Fettsäuren kälteprotektiv für den Stamm JH642. Im Gegensatz dazu zeigten die Zwischenprodukte der Biosynthese von Valin und Leucin keine kälteprotektive Funktion. Der Vergleich der Fettsäurezusammensetzung der Stämme JH642 und MR168 nach einem Kälteschock zeigte einen verringerten Anteil der verzweigten Fettsäuren in der Membran des JH642 und eine generelle Zunahme dieser Fettsäuren in beiden Stämmen nach einem

Kälteschock (Klein *et al.*, 1999). Der uncharakterisierte Defekt des JH642 müsste somit im Anpassungsprozess der Membran an tiefe Temperaturen lokalisiert sein. Aus diesem Grund wurde die Rolle des Biosyntheseweges verzweigtkettiger Fettsäuren bei der Kälteanpassung näher untersucht.

Dieser Stammunterschied war bereits während der Untersuchungen der *bkdR*, *sigL* und *ypfP* Deletionsmutanten in Abschnitt 4.2.2.2 aufgefallen und in Bezug auf diese drei Gene hin dort untersucht worden. Es konnte durch Sequenzanalysen kein Unterschied in den drei Genen *bkdR*, *sigL* und *ypfP* der Stämme MR168 und JH642 gefunden werden und so diese als Kandidaten verantwortlich für den uncharakterisierten Defekt ausgeschlossen werden. Ein Ausschnitt des Biosyntheseweges ist im Folgenden skizziert (Abb. 4.3-2).



**Abb. 4.3-2:** Biosyntheseweg von Threonin über Isoleucin zu  $\alpha$ -Ketosäuren

Für die Überlegungen um was für einen Defekt es sich im Stamm JH642 handeln könnte, gibt es zwei Möglichkeiten. Es könnte zum einen (a) zu wenig eines Enzyms, das für die Synthese von Zwischenprodukten im Biosyntheseweg zu den verzweigten Fettsäuren verantwortlich ist, in der Zelle vorhanden sein. Zum anderen könnte auch (b) ein Enzym in diesem Biosyntheseweg defekt sein und mit geringerer Effizienz arbeiten. In beiden Fällen würde sich ein Zwischenprodukt des Syntheseweges zu den verzweigten Fettsäuren nicht in ausreichender Menge in der für die Kälteanpassung der Membran notwendigen Zeit bilden und so den Kältephänotyp des JH642 verursachen. Im Falle von (a) zu wenig Enzym in der

Zelle würde die Fehlerquelle z. B. in Mutationen im Promotor oder Regulator der entsprechenden Gene zu vermuten sein. Im Falle (b) eines defekten Enzyms würden Mutationen in seiner DNA- bzw. Protein-Sequenz zu erwarten sein. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, können die Promotorregionen und Gene, die für die Regulatoren und Enzyme kodieren, sequenziert werden. Wenn ein defektes Enzym identifiziert werden kann, erlaubt eine biochemische Untersuchung eine nähere Charakterisierung.

Aus diesen Gründen wurden nachfolgend die Promotorregionen und beteiligten Gene im Biosyntheseweg von Threonin zu den  $\alpha$ -Ketosäuren hin sequenziert. Es gab bereits Hinweise auf einen eventuellen Defekt im *bkd*-Operon durch dessen unterschiedliche Induktion in den DNA-Array-Untersuchungen der Stämme MR168 (Kaan *et al.*, 2002) und JH642 (Beckerling *et al.*, 2002).

#### 4.3.1 Sequenzierung aller Gene im Biosyntheseweg zu den verzweigten Fettsäuren

Die im Folgenden aufgeführten Gene sind im Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Fettsäuren lokalisiert und wurden vollständig mit Promotorregion sequenziert (*ilvA*, *ilvB*, *ilvH*, *ilvC*, *ilvD*, *bkdR*, *ptb*, *bcd*, *buk*, *lpdV*, *bkdAA*, *bkdAB*, *bkdB*). Für die Sequenzierung der betreffenden Gene aus den Stämmen JH642 und MR168 wurden mittels PCR die Promotorregionen mit den dazugehörigen Genen amplifiziert (Abschnitt 3.2.2), gereinigt (Abschnitt 3.2.3) und in Konzentrationen von 50 ng/ $\mu$ L von der Firma GATC sequenziert (Sequenzierprimer Abschnitt 6.1).

Aus den Ergebnissen ergab sich nur für *ilvB* ein Unterschied in den Sequenzen der beiden Stämme (Abb. 4.3-3).

514	A	T	T	G	A	T	A	T	T	C	C	G	A	A	A	G	A	T	G	T	A	G	C	A	537	<i>ilvB</i> MR168
514	A	T	T	G	A	T	A	T	T	C	C	G	G	G	A	G	A	T	G	T	A	G	C	A	537	<i>ilvB</i> JH642

172	Ile	Asp	Ile	Pro	Lys	Asp	Val	Ala	179	<i>IlvB</i> MR168
172	Ile	Asp	Ile	Pro	Gly	Asp	Val	Ala	179	<i>IlvB</i> JH642

**Abb. 4.3-3:** Sequenz-Alignment von dem Gen *ilvB* und dem Protein *IlvB* aus *Bacillus subtilis* MR168 und JH642

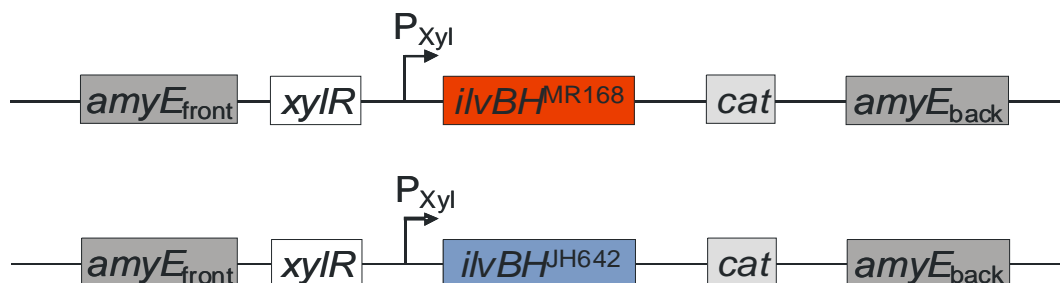
Im Gen *ilvB* des Stammes JH642 befinden sich an den Positionen 526 und 527 zwei Guanine, was mit dem an Position 528 befindlichen Adenin (GGA) für ein Glycin<sup>176</sup> kodiert. Im Stamm MR168 kodiert an derselben Position ein Triplet aus Adeninen (AAA) für ein Lysin<sup>176</sup>.

Dieser Unterschied ist möglicherweise für den beobachteten Defekt im Wachstum des Stammes JH642 verantwortlich. Im Weiteren wurde das *ilvB* Gen und das von ihm kodierte Enzym IlvB untersucht. Hierbei kann durch eine Komplementation des JH642 mit *ilvB* aus dem Stamm MR168 gezeigt werden, ob der gefundene Unterschied in der Gensequenz von *ilvB* wirklich für den unterschiedlichen Phänotyp in der Kälte verantwortlich ist. Eine biochemische Untersuchung kann dann die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Enzyme aus JH642 und MR168 zeigen.

### 4.3.2 Komplementationsstudien mit *ilvBH*

Bei IlvB handelt es sich um die große Untereinheit des Acetolactat Synthase-Komplexes aus *B. subtilis*. Die kleine Untereinheit wird von *ilvH* kodiert. Aus diesem Grund wird in allen weiteren Untersuchungen immer der Acetolactat Synthase-Komplex (ALS-Komplex) aus IlvB mit IlvH verwendet. Um zu zeigen, ob der gefundene Unterschied in den Gensequenzen von *ilvB* der beiden Wildtypstämme JH642 und MR168 (Abschnitt 4.3.1) den unterschiedlichen Phänotyp nach einem Kälteschock verursacht, wurde eine *in trans* Komplementationsstudie durchgeführt.

Hierbei wurden die Gene *ilvB* und *ilvH* zusammen mit den Primern 5'-*ilvB\_amy2* (*SpeI*) und 3'-*ilvB\_amy3* (*BamHI*) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* MR168 und JH642 amplifiziert und gereinigt. Nachdem die MR168- und JH642-PCR-Fragmente mit *SpeI* und *BamHI* verdaut worden waren, wurde sie in einen gleichermaßen geschnittenen pX-Vektor gerichtet ligiert. Es wurden die Komplementationsstämme JH642 *amyE::ilvB ilvH<sub>MR168</sub>* (FW17) und JH642 *amyE::ilvB ilvH<sub>JH642</sub>* (FW18) erhalten (**Abb. 4.3-4a**).



**Abb. 4.3-4a:** Komplementationsstämme JH642 *amyE::ilvB ilvH<sub>MR168</sub>* (FW17) und JH642 *amyE::ilvB ilvH<sub>JH642</sub>* (FW18)

Diese Stämme wurden nun einem Wachstumsexperiment im Vergleich zu den Wildtypen MR168 und JH642 unterzogen (Abschnitt 3.1.2). Sie wurden in SMM-Medium mit den



Zusätzen Tryptophan, Phenylalanin, Spurenelementen und Fruktose untersucht (Abschnitt 2.5). Um einen Effekt der *in trans* Integration in den JH642 im Vergleich zum WT MR168 beobachten zu können, wurde für diese Untersuchung auf den Zusatz von Isoleucin zum Medium verzichtet, da der Zusatz von Isoleucin den Kältephänotyp überdecken würde. Zur Induktion der *in trans* in das *amyE* Gen integrierten Gene wurde 0,5 % Xylose zum Zeitpunkt des Kälteschocks zugesetzt.

Nachfolgend ist die Wachstumskurve der Wildtypen MR168 und JH642 und der zwei Komplementationsstämme FW17 und FW18 nach einem Kälteschock gezeigt (Abb. 4.3-4b).

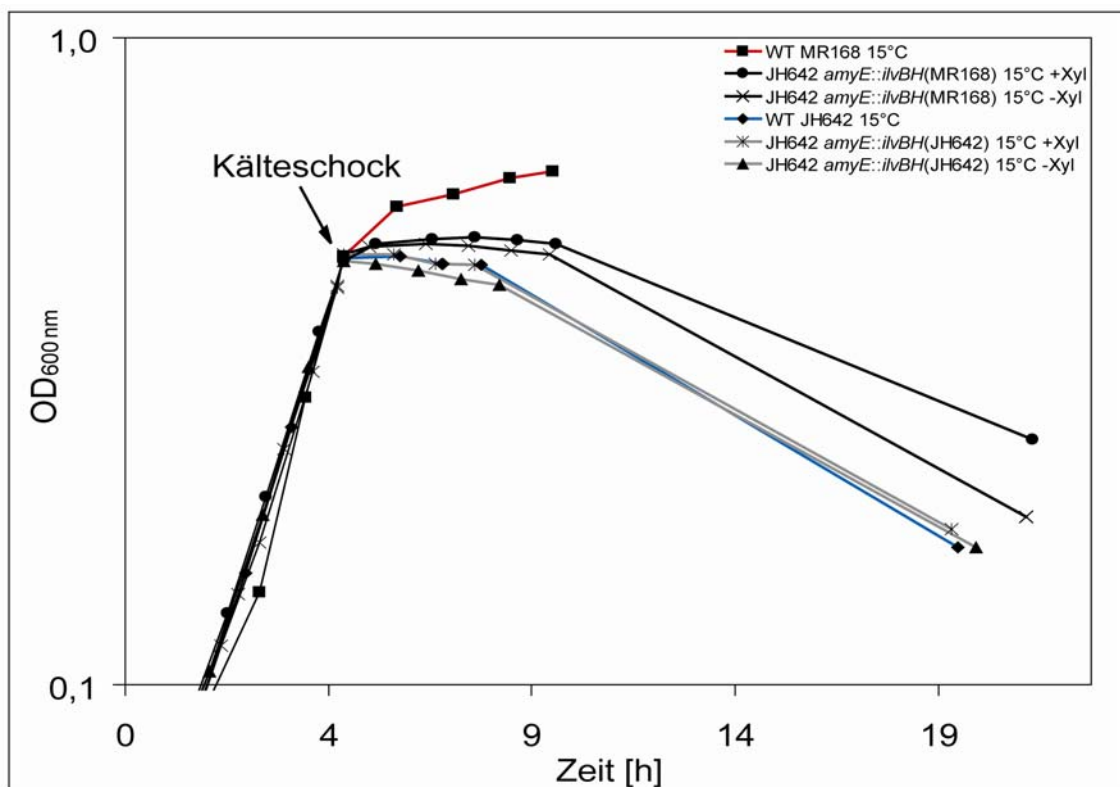


Abb. 4.3-4b: Wachstumskurve von *Bacillus subtilis* MR168, JH642, JH642 *amyE::ilvB* *ilvH*<sub>MR168</sub> (FW17) und JH642 *amyE::ilvB* *ilvH*<sub>JH642</sub> (FW18) nach einem Kälteschock

Aus der Wachstumskurve ist zu erkennen, dass der Kontrollstamm JH642 *amyE::ilvB* *ilvH*<sub>JH642</sub> (FW18) sowohl mit Xylose induziert als auch nicht induziert nicht besser wächst als der Wildtyp JH642. Der Komplementationsstamm JH642 *amyE::ilvB* *ilvH*<sub>MR168</sub> (FW17) hingegen wächst auch schon ohne Induktion durch Xylose wesentlich besser als der Wildtyp JH642. Der induzierte Stamm FW17 wächst im Vergleich dazu noch besser, erreicht allerdings nicht das Niveau des Wildtyps MR168. Dennoch kann dieses Ergebnis als eindeutiger Hinweis für die Lokalisierung des uncharakterisierten Defekts in *ilvB* des JH642 gewertet werden.

Um die zwei Enzyme IlvB aus dem Stamm JH642 (IlvB\*) und IlvB aus MR168 (IlvB) biochemisch untersuchen zu können, wurden die entsprechenden Proteine nachfolgend überproduziert und gereinigt.

#### 4.3.3 Klonierung, Expression und Reinigung von IlvB, IlvB\* und IlvH

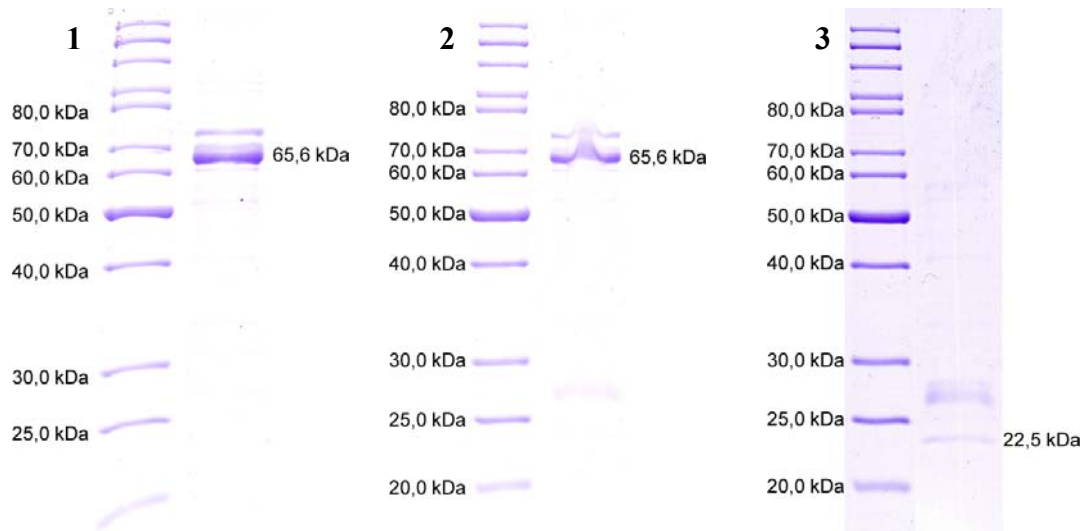
Für die nachfolgende biochemische Charakterisierung wurden zunächst die Gene *ilvB* aus *B. subtilis* MR168 (*ilvB*), aus JH642 (*ilvB\**) und *ilvH* aus MR168 in den Expressionsvektor pNKH1 (Abschnitt 2.3.3) kloniert, die rekombinanten Proteine heterolog in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Abschnitt 3.4.1). Im Folgenden ist die Konstruktion der Expressionsplasmide beschrieben:

**Konstruktion von FW-Exp4 (pNKH1 mit *ilvB*):** Der für IlvB kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*ilvB*\_Expression (*Nco*I) und 3'-*ilvB*\_Expression (*Bam*HI) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* MR168 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut worden war, wurde es in einen mit *Nco*I und *Bgl*II geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

**Konstruktion von FW-Exp5 (pNKH1 mit *ilvB\**):** Der für IlvB kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*ilvB*\_Expression (*Nco*I) und 3'-*ilvB*\_Expression (*Bam*HI) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut worden war, wurde es in einen mit *Nco*I und *Bgl*II geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

**Konstruktion von FW-Exp6 (pNKH1 mit *ilvH*):** Der für IlvH kodierende Genabschnitt wurde mit den Primern 5'-*ilvH*\_Expression (*Nco*I) und 3'-*ilvH*Exprichtig (*Bam*HI) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* MR168 amplifiziert. Nachdem das PCR-Fragment mit *Nco*I und *Bam*HI verdaut worden war, wurde es in einen mit *Nco*I und *Bgl*II geschnittenen pNKH1-Vektor gerichtet ligiert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert und auf LB Kan<sup>50</sup> Platten selektiert.

Nachdem die konstruierten Expressionsplasmide vollständig sequenziert waren, wurden die rekombinanten Proteine überproduziert und nach Ni-NTA-Reinigung mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit und richtige Größe hin kontrolliert.

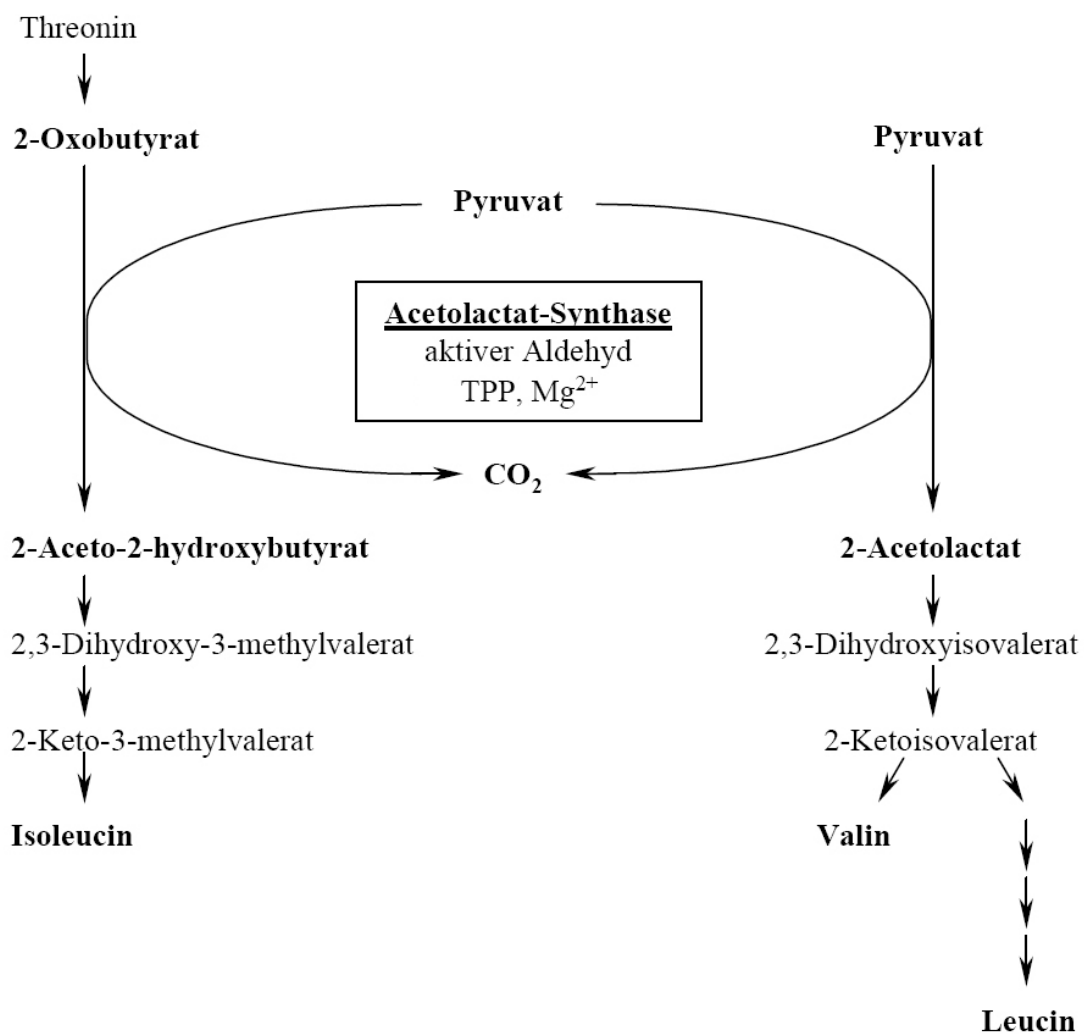


**Abb. 4.3-5:** SDS-PAGE (12 %iges Gel) von IlvB (1), IlvB\* (2) und IlvH (3)

Die exprimierten Proteine zeigten die richtigen Größen (IlvB 65,6 kDa, IlvB\* 65,6 kDa, IlvH 22,5 kDa) und wurden zusätzlich noch durch einen tryptischen Verdau mit nachfolgender massenspektrometrischer Identifizierung überprüft (Abschnitt 3.4.2.15). Hierbei konnten die Proteine IlvB, IlvB\* und IlvH eindeutig nachgewiesen werden.

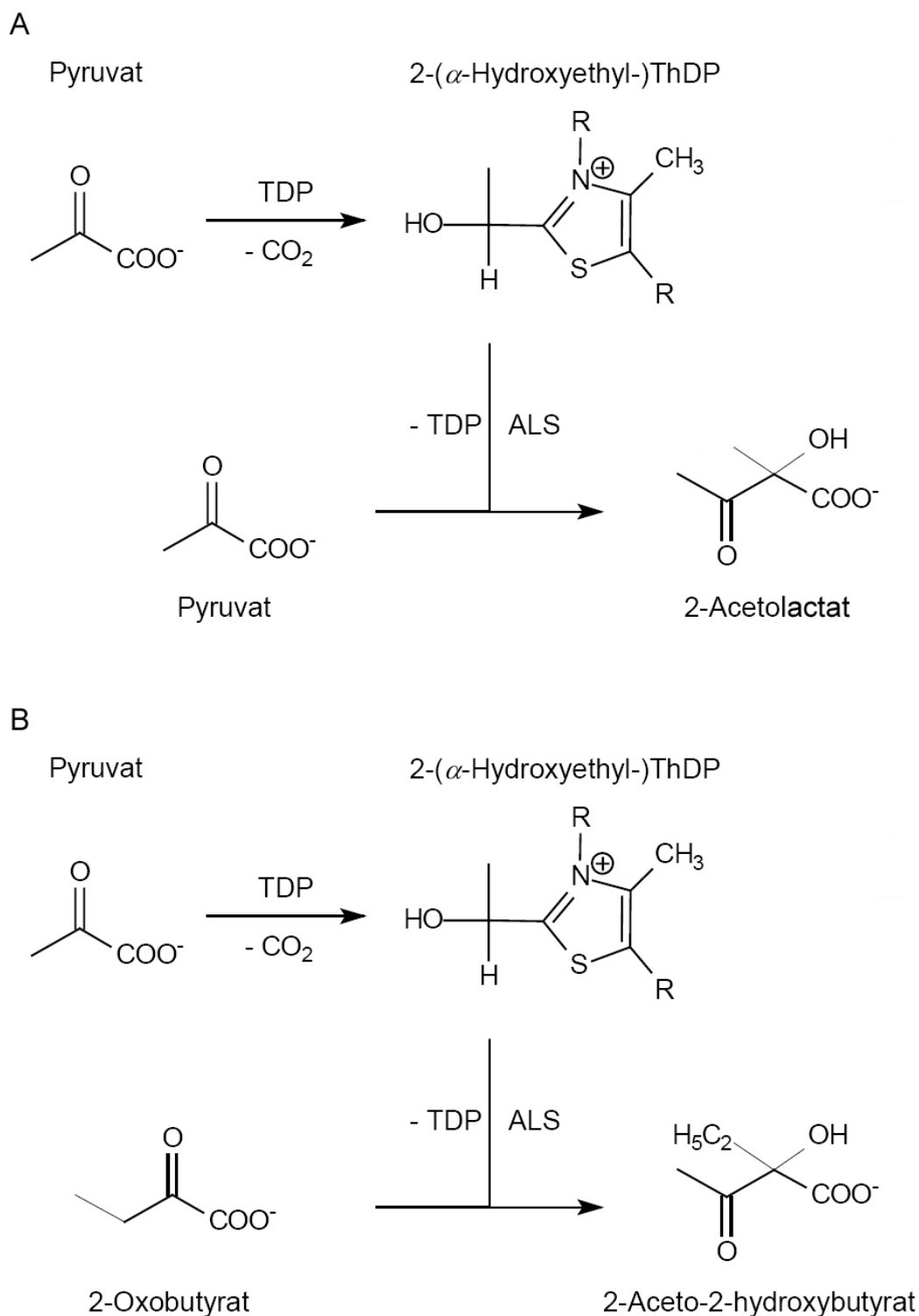
#### 4.3.4 Bestimmung der katalytischen Aktivität von IlvBH

Der Acetolactat Synthase-Komplex (ALS-Komplex) katalysiert den ersten allgemeinen Schritt des gegabelten Biosyntheseweges zu den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Dabei katalysiert der ALS-Komplex sowohl die Kondensation zweier Moleküle Pyruvat zu einem Molekül 2-Acetolactate in der Valin- und Leucin-Biosynthese, als auch die Bildung von 2-Aceto-2-hydroxybutyrat aus Pyruvat und 2-Oxobutytrat in der Biosynthese von Isoleucin (zweiter Schritt in *Abb. 4.3-2*). Im Folgenden sind diese zwei Reaktionen noch einmal schematisch zusammengefasst (*Abb. 4.3-6*).



*Abb. 4.3-6:* Biosyntheseweg zu den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin

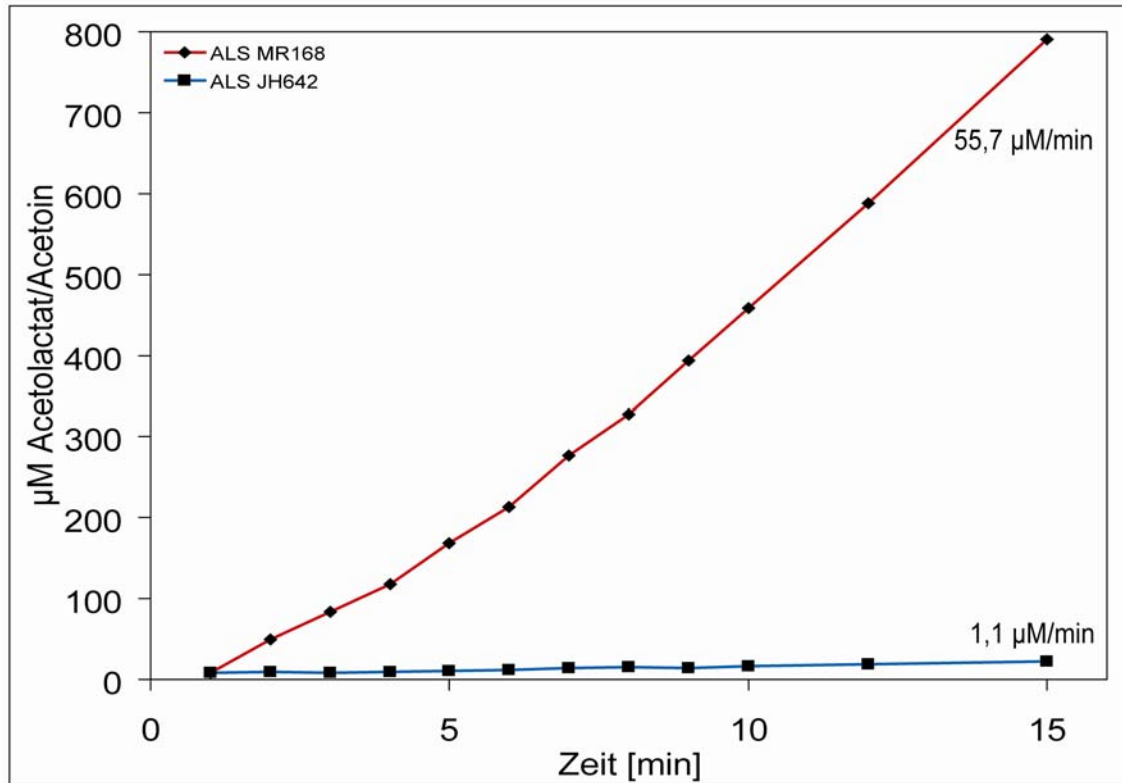
Die detaillierten Reaktionen sind in *Abb. 4.3-7* dargestellt.



**Abb. 4.3-7:** A – Kondensation zweier Pyruvatmoleküle zu 2-Acetolactat; B – Bildung von 2-Aceto-2-hydroxybutyrat aus Pyruvat und 2-Oxobutyrat

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der ALS-Komplexe aus JH642 und MR168 wurde die Reaktion **A** aus **Abb. 4.3-7** verwendet. Hierbei wurden die zuvor exprimierten und gereinigten Enzyme (Abschnitt **4.3.3**) wie in Abschnitt **3.4.3.2** beschrieben in Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  eingesetzt und die Geschwindigkeiten der Produktbildung von

Acetolactat bei 10 mM Substratkonzentration an Pyruvat bestimmt. Im Folgenden ist die Produktbildungsgeschwindigkeit am Beispiel einer Substratkonzentration von 10 mM Pyruvat gezeigt.



**Abb. 4.3-8:** Produktbildungsgeschwindigkeit von 1 µM Acetolactate-Synthase aus *Bacillus subtilis* MR168 und JH642 mit einer Substratkonzentration von 10 mM Pyruvat

Es ist hier deutlich zu erkennen, dass der ALS-Komplex IlvBH aus MR168 mit 55,7 µM/min fast 51-mal mehr Acetolactat pro Minute bilden kann als der ALS-Komplex IlvB\*H aus JH642. Die Mutation in IlvB scheint demnach verantwortlich für den Wachstumsdefekt des JH642 nach einem Kälteschock zu sein.

## 5. Diskussion

Bei der großen Vielfalt an Stressarten, wie Hitze-, Kälteschock, Salzstress oder Nährstoffmangel, ist das Ziel neue Mechanismen zu finden, die unter diesen Bedingungen für das Überleben von *B. subtilis* verantwortlich sind. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Anpassung von *B. subtilis* nach einem Kälteschock. Es sind verschiedene Systeme des Bakteriums von einem Kälteschock betroffen, z. B. die kinetisch behinderte Initiation der Translation, die durch kältestabilisierte Sekundärstrukturen der mRNA zu Stande kommt, die verlangsamte Proteinbiosynthese am Ribosom und die abnehmende Fluidität der Zellmembran.

In dieser Arbeit wurde das System der  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren AcoR, BkdR, LevR, RocR und YlpP mit ihrem  $\sigma^L$ -Faktor in Bezug auf die Anpassung nach einem Kälteschock näher untersucht. Hierbei sollten die vom bereits als kälterelevant nachgewiesenem putativen Aktivator YlpP regulierten Gene mittels DNA-Arrays identifiziert und durch einen biochemischen EMSA charakterisiert werden. Des Weiteren wurde der Grund für das unterschiedliche Wachstum der Wildtypstämme JH642 und MR168 untersucht und aufgeklärt. In Vorarbeiten wurde bereits postuliert, dass dieser Defekt im Biosyntheseweg zu den verzweigtkettigen Fettsäuren lokalisiert ist (Klein *et al.*, 1999). Um darüber hinaus weitere kälterelevante Systeme zu identifizieren, wurden die Transkriptionsanalyse mittels DNA-Arrays und die Analyse des Proteoms durch zweidimensionale Gelelektrophorese in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

### 5.1 Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine und Gene

In klassischen Untersuchungen an Mikroorganismen wurde oft zuerst ein kältesensitiver Phänotyp beobachtet und erst anschließend das entsprechende kältespezifische Protein bzw. Gen identifiziert. Durch die heute zugänglichen Methoden der zweidimensionalen Gelelektrophorese zur Analyse des Proteoms und der genomweiten Transkriptionsanalyse durch DNA-Arrays lassen sich die an einer Stressadaptation beteiligten Proteine und Gene auf direktem Wege identifizieren. Die zunehmenden Sequenzierungsdaten einer Vielzahl von Organismen erleichtern dabei die Interpretation der Proteom- und Transkriptionsanalysen und vereinfachen durch Sequenzvergleiche die Zuordnung der identifizierten kälteinduzierten Proteine und Gene zu funktionellen Gruppen. Hierbei erzielen diese beiden Methoden viele Übereinstimmungen und lassen sich auch gut kombinieren. Die aus den DNA-Arrays gewonnenen Daten geben einen Überblick über alle an der Kälteadaptation beteiligten Gene.

Aus dieser Vielzahl an Genen kann eine bestimmte funktionelle Gruppe des Interesses herausgenommen werden und in Bezug auf das Proteom mittels der zweidimensionalen Gelelektrophorese näher untersucht werden.

Ein Beispiel für die gute Übereinstimmung der beiden Methoden sind die kälteinduzierten CSPs (cold shock proteins). Frühere Studien mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigten die starke Kälteinduktion der CSPs (Graumann *et al.*, 1996), die wiederum auch durch die genomweite Transkriptionsanalyse von kältegeschocktem *B. subtilis* nachgewiesen werden konnte (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002). Ebenso ergaben sich aus den Transkriptionsanalysen viele kälteinduzierte Y-Gene wie z. B. *ylaG*, die auch auf Proteinebene stark induziert sind (Wiegeshoff, 2003).

Die Kombination der beiden Methoden zur Charakterisierung von kälteinduzierten Proteinen und Genen wurde zum Beispiel bei der Untersuchung der Translationsmaschinerie am Ribosom und der DNA-Topologie verwendet. Es wurde durch Transkriptionsstudien nachgewiesen, dass die DEAD-Box RNA-Helikasen YdbR/YqfR (CshA/CshB) zusammen mit den RNA-Chaperonen CspB/CspC/CspD und die DNA-Gyrase GyrAB nach einem Kälteschock hoch induziert sind (Abschnitt 1.3.1 und 1.3.3) (Beckering *et al.*, 2002, Kaan *et al.*, 2002). Doppeldeletionsmutanten der CSPs/Helikasen zeigten in Wachstumsstudien kältespezifische Phänotypen und wurden mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach nicht mehr in der Kälte exprimierten kälterelevanten Proteinen hin untersucht (Wiesner, 2006). Die kälteinduzierte Gyrase ist ein weiteres Beispiel für die Kombination der beiden Analysemethoden. Sie ist dafür verantwortlich, dass die negative Verdrillung (*supercoil*) der DNA unter Kälteschockbedingungen zunimmt. In der Doktorarbeit von Karen Hunger wurden Proteine mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese identifiziert, deren Induktion auf Proteinebene von der Induktion der Gyrase abhängig ist (Hunger, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde durch Verwendung der genomweiten Transkriptionsanalyse mittels DNA-Arrays und Proteomanalyse mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese nach weiteren bisher unbekannten kälteinduzierten Genen und Proteinen gesucht, die durch ihre Kälteinduktion möglicherweise an der Anpassung von *B. subtilis* nach einem Kälteschock beteiligt sein könnten.

### **5.1.1 Funktionelle Einordnung der kälteinduzierten Proteine aus der Analyse des Proteoms**

Um die veränderte Proteinbiosynthese nach einem Kälteschock näher zu untersuchen, bedient man sich der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese. Mit ihr ist es möglich



Unterschiede in der Proteinbiosynthese der Zelle zwischen dem Wachstum bei 37 °C und dem nach einem Kälteschock auf 15 °C zu beobachten.

Durch die verbesserte Methode der 2D-Gelelektrophorese wurden in dieser Arbeit der verwendete pH-Bereich von 4-7 der Gele in die pH-Bereiche 4-5 und 5-6 aufgeteilt. Somit wurde pro Gel ein kleinerer pH-Bereich abgedeckt. Diese „Aufspreizungen“ ermöglichten eine bessere Auflösung der Gele, um bei dem zuvor verwendeten pH-Bereich 4-7 mögliche überlagerte Proteinspots voneinander trennen zu können.

Dieses Projekt wurde in Kooperation mit Karen Hunger durchgeführt und beschäftigte sich mit der Identifizierung von generell kälteinduzierten Proteinen (Abschnitt 4.1) durch Aufspreizungen des pH-Bereichs. Hierbei wurde zwischen den allgemein kälteinduzierten und den von der DNA-Gyrase abhängigen kälteinduzierten Proteinen unterschieden.

In dieser Studie konnten insgesamt 13 kälteinduzierte Proteine identifiziert werden. Davon waren acht durch die von der kälteinduzierten Gyrase eingeführten negativen *supercoil* der DNA abhängig. Diese scheinen demnach topologisch reguliert kälteinduziert zu sein (Hunger, 2006). Des Weiteren wurden fünf allgemein, topologisch unabhängig kälteinduzierte Proteine gefunden, die im Folgenden diskutiert werden sollten (**Tab. 4.1-1** Abschnitt 4.1.1).

Das Protein DapB ist eine Dihydropicolinat Reduktase und ist in der Aminosäurebiosynthese involviert. Im Vergleich zu den Transkriptionsanalysen (**Tab. 4.1-2** Abschnitt 4.1.2 und Abschnitt 5.1.2), die eine Repression des Gens *dapB* zeigen, ist das Protein DapB auf Proteinebene induziert. Dieses ist etwas unerwartet, da die Aminosäurebiosynthese nach einem Kälteschock einer Repression unterliegen sollte. Gleiches gilt auch für den Energiestoffwechsel, in dem die Malatdehydrogenase (Mdh) arbeitet. Diese ist, obwohl sie transkriptionell (1,1x) nicht induziert ist, auf Proteinebene als induziert gefunden worden. Das ribosomale Protein S9 (RpsF) ist übereinstimmend mit den Transkriptionsanalysen induziert und ist in der Initiation der Translation beteiligt. Diese ist bei sinkenden Temperaturen durch Ausbildung von kältestabilisierten mRNA-Sekundärstrukturen behindert. Aus diesem Grund ist die Induktion von Proteinen, die die Translation bei niedrigen Temperaturen gewährleisten können, wichtig für das Überleben von *B. subtilis*. Die Induktion ribosomaler Proteine wurde auch in früheren Studien des Proteoms mittels 2D-PAGE nachgewiesen (Beckering, 2004, Graumann *et al.*, 1996, Wiegeshoff, 2003).

Des Weiteren ergab sich auch die Induktion von Proteinen mit unbekannter Funktion. Das Protein Yj1C, welches keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen aufweist, und YvyD, das Ähnlichkeiten zu  $\sigma^{54}$ -modulierenden Faktoren aus Gram-negativen Bakterien aufweist, waren unter den induzierten Proteinen zu finden. Diese unbekannten Proteine wurden als

interessanteste Kandidaten angesehen, um neue Mechanismen der Kälteanpassung untersuchen zu können. Aus diesem Grund wurden die für YjlC und YvyD kodierenden Gene deletiert und Wachstumsanalysen der Deletionsmutanten durchgeführt. Die Diskussion dieser Ergebnisse erfolgt zusammen mit den Ergebnissen der Gendeletionen aus der Analyse des Transkriptoms in Abschnitt 5.1.3.

Zusammenfassend lässt sich an dieser Stelle sagen, dass die Anzahl der als kälteinduziert gefundenen Proteine bei weitem nicht so groß ist wie die der Transkriptionsanalyse des *B. subtilis* Wildtyps JH642 (Tab. 4.1-2 Abschnitt 4.1.2). Dies liegt an den Beschränkungen der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Mit ihr lassen sich nur die löslichen Proteine in einem begrenzten pH-Bereich auflösen. Somit sind viele Membranproteine und lösliche Proteine mit einem pI außerhalb des untersuchten pH-Bereichs 4-7 in diesen Untersuchungen nicht zu finden. Ebenso ist zu bedenken, dass die massenspektrometrische Identifizierung der Proteine immer von der Menge an zur Verfügung stehendem Protein im entsprechenden Proteinspot des 2D-Gels abhängt. Demnach können bestimmte Proteine, die nur in geringen Mengen in der Zelle vorkommen, nur sehr schwer identifiziert werden. Aus diesem Grund ist es unerlässlich die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese mit der genomweiten Transkriptionsanalyse durch DNA-Arrays zu koppeln. Diese verschafft einen Gesamtüberblick über alle kälteinduzierten Gene. Aus diesem Überblick lassen sich dann funktionelle Proteingruppen ableiten, wie z. B. die RNA-Helikasen und CSPs oder die durch die DNA-Gyrase kälterregulierten Proteine, die dann auf Proteinebene untersucht werden können (Hunger, 2006, Wiesner, 2006).

### 5.1.2 Funktionelle Einordnung der kälteinduzierten Gene aus der Analyse des Transkriptoms

Die genomweite Transkriptionsanalyse ermöglicht durch den Vergleich der mRNA-Mengen von *B. subtilis* JH642 bei 37 °C und 15 °C einen umfassenden Überblick über alle kälterregulierten Gene (Abschnitt 4.1.2). Es wurden ca. 130 kälteinduzierte und 250 kältereprimierte Gene identifiziert. Unter den 130 mehr als zweifach induzierten Genen konnten 81 Gene mit noch unbekannter Funktion identifiziert werden. Gerade diese Gruppe steht im Mittelpunkt fortlaufender Untersuchungen, da sie potentielle neue Kandidaten für eine Beteiligung an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* sind. Den größeren Anteil bilden jedoch die mehr als zweifach reprimierten Gene (250). Auch die Identität und Funktion der reprimierten Gene verschafft einen Einblick in die adaptiven Prozesse, die während eines Kälteschocks in *B. subtilis* ablaufen. Die einzelnen Gene lassen sich in Gruppen nach ihrer

Funktion sortiert unterteilen. Diese Gruppen sind die Translation, mRNA-Strukturierung, DNA-Topologie, Molekültransport, Energiestoffwechsel, Aminosäurebiosynthese, Nukleotidbiosynthese und Hitzeschockgene. Des Weiteren wird noch die Gruppe der Gene mit unbekannter Funktion diskutiert werden. Die Einteilung deckt sich größtenteils mit früheren Untersuchungen des Stammes JH642 (Beckering *et al.*, 2002). Die Beschreibung beschränkt sich im Folgenden auf prominente Vertreter und Abweichungen zu den bisherigen Untersuchungen.

#### 5.1.2.1 Translation

Bei sinkenden Temperaturen ist die Initiation der Translation für das Wachstum der Mikroorganismen ein limitierender Faktor (Abschnitt 1.3.1). In der Kälte bildet die mRNA kältestabilisierte Sekundärstrukturen aus, die einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Translationsinitiation haben (Hall *et al.*, 1982, Wulff *et al.*, 1984). Aus diesem Grund ist eine Induktion von Genen zu erwarten, deren Genprodukte die Translation bei niedrigen Temperaturen gewährleisten können. In dieser Gruppe von Genen wurden die für ribosomale Proteine kodierende Gene *rplF* (L6), *rplN* (L14), *rplO* (L15), *rplP* (L16), *rplR* (L18), *rplX* (L24), *rpmC* (L29), *rpmD* (L30), *rpmE* (L31), *rpmJ* (L36), *rpsC* (S3), *rpsD* (S4), *rpsE* (S5), *rpsH* (S8), *rpsK* (S11), *rpsM* (S13), *rpsN* (S14), *rpsP* (S16), *rpsQ* (S17) und *rpsS* (S19) mit zwei- bis dreifacher Induktion gefunden. Dieses deckt sich mit den Untersuchungen von Beckering *et al.* Die Kälteinduktion ribosomaler Proteine wurde auch schon durch Proteomanalysen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese gezeigt (Graumann *et al.*, 1996), was die Ergebnisse aus den DNA-Arrays bestätigt. Ebenso sind die für initiationsfaktorhomologe Proteine kodierenden Gene *infA* und *infB* zweifach induziert. Die bereits gezeigte Kälteinduktion des *rbfA* Gens aus *B. subtilis* konnte ebenfalls bestätigt werden. Für RbfA aus *E. coli* wurde eine Bindung an die 30S-Untereinheit des Ribosoms, die die Translationsinitiation einleitet, bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen (Dammel und Noller, 1995) und erklärt somit die zweifache Kälteinduktion.

#### 5.1.2.2 mRNA-Strukturierung

Chaperone spielen in der mRNA-Strukturierung eine große Rolle. Die Funktion der kälteinduzierten CSPs als RNA-Chaperone wurde schon vielfach diskutiert (Graumann und Marahiel, 1999). Die starke Induktion der CSPs konnte auch in dieser Studie nachgewiesen

werden. So ist *cspC* sechsfach induziert und *cspB* und *cspD* zweifach. Beckering *et al.* konnte über Sequenzvergleiche zeigen, dass die hoch induzierten Gene *ydbR* und *yqfR* Homologien zu DEAD-Box RNA-Helikasen aus anderen Organismen wie z. B. CsdA aus *E. coli* (Jones *et al.*, 1987) aufweisen. In späteren Untersuchungen von Hunger *et al.* (2006) konnte eine Zusammenarbeit dieser zwei funktionellen Einheiten bewiesen werden. In dieser Transkriptionsstudie konnte auch hier eine starke dreifache Induktion der DEAD-Box Helikasen *ydbR* und *yqfR* nachgewiesen werden. In den Studien von Hunger *et al.* wurden diese Genprodukte in die DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB umbenannt.

### 5.1.2.3 DNA-Topologie

In der Kälte wird die DNA-Topologie stark verändert (Krispin und Allmansberger, 1995). Die negative Superspiralisierung (*supercoil*), die durch die DNA-Gyrase eingeführt wird, nimmt stark zu. Die Gene *gyrA* und *gyrB*, die für die zwei Untereinheiten der DNA-Gyrase kodieren, konnten in dieser Studie als dreifach kälteinduziert gefunden werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Topoisomerase I, die vom Gen *topA* kodiert wird und für die Entspiralisierung des negativen *supercoils* verantwortlich ist, eine zweifache Repression unter Kälteschockbedingungen. Diese antagonistische Regulation ist wahrscheinlich verantwortlich für die Zunahme der negativen Superspiralisierung bei niedrigen Temperaturen, und damit für die Expression eines veränderten Satzes an Genen. Dieses lässt den Schluss zu, dass die Superspiralisierung der DNA ein Instrument zur allgemeinen Kältereulation der Genexpression ist. Diese Ergebnisse decken sich wiederum mit den früheren Untersuchungen (Beckering *et al.*, 2002). Den Einfluss der negativen Superspiralisierung nach einem Kälteschock auf die Expression von somit topologisch regulierten, kälteinduzierten Proteinen wird in der Doktorarbeit von Karen Hunger behandelt. Hierbei wird der Gyrase-Hemmer Novobiocin verwendet und der Proteinextrakt von *B. subtilis*, dessen Gyrase inhibiert ist, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese im Vergleich zu unbehandeltem Wildtyp Proteinextrakt auf nicht mehr exprimierte Proteine hin untersucht. Beispiele für solche Kandidaten sind in **Tab. 4.1-1** in Abschnitt 4.1.1.1 aufgeführt. Auch hier zeigt sich wieder die gute Kombinationsmöglichkeit der Transkriptionsanalyse zur Identifizierung von kälterelevanten Kandidaten, die anschließend auf Proteinebene mit 2D-PAGE detaillierter untersucht werden können.

#### 5.1.2.4 Molekültransport

In früheren Untersuchungen zum Transport von Molekülen durch die Membran wurden ABC-Transporter identifiziert. Bei der Untersuchung zum Salzstress wurden osmoprotektive Substanzen wie das Glycin-Betain selektiv über die Membran in die Zelle befördert (Bremer, 2002). In *B. subtilis* konnte von Beckering *et al.* und in dieser Studie die vier- bis neunfache Induktion des *ytrABCDEF*-Operons nachgewiesen werden, das starke Homologien zu ABC-Transportern aufweist. Bis jetzt konnte allerdings die Charakterisierung des Operons als ABC-Transporter nicht nachgewiesen werden. Ansätze, dass es sich um einen Acetoin-ABC-Transporter von *B. subtilis* handeln könnte (Yoshida *et al.*, 2000), wurden nicht bestätigt (Hunger, 2002). Die vier- bis neunfache Induktion auf Transkriptionsebene weist jedoch auf eine Rolle dieses putativen ABC-Transporters in der Kälteschockantwort von *B. subtilis* hin.

#### 5.1.2.5 Energiestoffwechsel, Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese

Nach einem Kälteschock zeigt der *B. subtilis* JH642 ein verlangsamtes Wachstum. In Transkriptionsstudien wurde nach einem Kälteschock die Repression von Genen beobachtet, die für Proteine zentraler Stoffwechselfunktionen kodieren, wie z. B. den Energiestoffwechsel, die Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese. Diese Repression von Genen des Primärstoffwechsels könnte demnach mit dem verlangsamten Wachstum in Verbindung gebracht werden.

So konnte die zwei- bis dreifache Repression der ATP-Synthasegene *atpABEFHI* gemessen werden. Ebenfalls zweifach reprimiert sind Gene der Glykolyse (*pgi*, *pgk* und *tpi*), der Pyruvat Dehydrogenase (*pdhABCD*) und des Zitronensäurezyklus (*sucC*, *sdhC* und *citG*). Damit sind viele Wege zur Energiegewinnung in der Zelle reprimiert.

Des Weiteren konnte die Repression der zur Biosynthese unpolarer (Gly, Val, Met und Leu), polarer (Ser, Thr, Pro und Gln), geladener (Arg, His und Asp) und aromatischer Aminosäuren (Phe, Tyr und Trp) gehörenden Gene bestätigt werden. Dagegen sind Gene, wie *ilvABHC* nicht reprimiert, sondern werden nahezu konstant nach einem Kälteschock transkribiert. Dieses scheint mit der Membrananpassung des *B. subtilis* in der Kälte zusammenzuhängen. Diese verläuft über die Degradation des vom *ilv*-Operon synthetisierten Isoleucins zu verzweigten  $\alpha$ -Ketosäuren, die ihrerseits als Substrate für die Synthese von verzweigten Fettsäuren dienen. So wird die Membran durch *de novo* synthetisierte verzweigte Fettsäuren angepasst.

Unter Kälteschockbedingungen wächst *B. subtilis* langsamer. Dieses verringerte Wachstum führt zu einem verringerten Verbrauch an Synthesematerial. Dadurch könnte es zu einer Akkumulation von Aminosäuren kommen, die durch *feedback*-Regulation die Transkription ihrer Gene inhibiert.

Dieses könnte ebenso auf die Verfügbarkeit von Nukleotiden für die DNA-Polymerase angewendet werden. Die gesteigerte Verfügbarkeit führt zur Akkumulation von Nukleotiden und könnte die Repression des *prs* Gen erklären, welches mit der PRPP-Synthetase für ein Protein kodiert, welches den Startpunkt der Purin und Pyrimidinbiosynthese markiert (Arnvig *et al.*, 1990). Ebenfalls reprimiert sind die Gene, die für Proteine der Biosynthese von Inosin-5'-monophosphat kodieren, dem Ausgangssubstrat für die Biosynthese von ATP und GTP, sowie die meisten Gene des anschließenden Stoffwechselweges der Purine (*purBCEFKLMNQ*, *guaB* und *ndk*). Auch Gene der Pyrimidinbiosynthese (*pyrABC*, *smBA* und *ndk*) sowie *upp* für den Pyrimidinumsatz sind reprimiert. Schließlich sind noch die Gene der Biosynthese des nukleotidhaltigen Kofaktors NAD reprimiert (*nifS* und *nadABC*).

#### 5.1.2.6 Hitzeschockgene

Die Ergebnisse aus den DNA-Arrays dieser Transkriptionsstudie und der von Beckering *et al.* zeigen eine starke Repression einer Vielzahl von Hitzeschockgenen. Alle Gene der beiden Operons (*hrcA*, *grpE*, *dnaKJ*, *yqeTU* und *groEL*, *groES*), die für Klasse I Hitzeschockproteine kodieren, sind nach Kälteschock von 37 °C auf 15 °C drei- bis siebenfach reprimiert. Diese Klasse von Hitzeschockproteinen wird durch den HrcA-CIRCE Mechanismus reguliert, der nach Akkumulation hitzedenaturierter Proteine in Kraft tritt (Mogk *et al.*, 1997). Auch Hitzeschockgene der Klasse III (*clpP*) und IV (*ahpCF*) sind zwei- bis dreifach auf Transkriptionsebene reprimiert. Untersuchungen durch 2D-Gelelektrophorese konnten die Repression von GroES und ClpP auch auf Proteinebene zeigen (Graumann und Marahiel, 1996, Wiegeshoff, 2003). Somit kann *B. subtilis* durch die Repression von Hitzeschockproteinen nach Kälteschock die zur Verfügung stehenden Ressourcen sparen und sich auf die Kälteadaptation konzentrieren.

#### 5.1.2.7 Y-Gene

Frühere Studien des Transkriptoms von *B. subtilis* zeigten die starke Induktion einer Reihe von Genen mit unbekannter Funktion. Diese und noch weitere Vertreter konnten in dieser

Arbeit bestätigt bzw. identifiziert werden. So ist das für einen putativen  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivator kodierende Gen *ypIP* nach einem Kälteschock zehnfach induziert. Dies und die zwei- bis dreifache Induktion des Sigmafaktor L veranlasste eine intensivere Untersuchung dieses Sigmafaktors und seiner Aktivatoren für die Kälteanpassung von *B. subtilis* (Abschnitt 5.2.1). Des Weiteren wurden auch andere unbekannte Gene wie z. B. *ylaG*, was sowohl auf Transkriptionsebene (fünffache Induktion) als auch das entsprechende Genprodukt von *ylaG* auf Proteinebene nach einem Kälteschock als stark kälteinduziert gefunden. Die durch Deletionsstudien charakterisierten Gene *ybdO*, *ycnL*, *ydeB*, *yesX*, *ydjO*, *yhfH*, *yoaS* und *veg* (Beckerling, 2004, Wiegeshoff, 2003) konnten ebenfalls als stark kälteinduziert (fünf- bis 12-fach) bestätigt werden. Darüber hinaus wurden weitere Gene (*ybaE*, *ydhM*, *ysbA*, *ywaC*, *yshA* und *yscB*) als vier- bis 12-fach kälteinduziert gefunden. Diese wurden ebenfalls durch Gendeletionen mit anschließender Analyse des Wachstumsverhaltens nach einem Kälteschock auf ihre Rolle für die Kälteanpassung des *B. subtilis* untersucht.

### 5.1.3 Funktionelle Charakterisierung kälteinduzierter Proteine und Gene

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese und genomweite Transkriptionsanalyse wurden zahlreiche kälteinduzierte Proteine und Gene identifiziert, die möglicherweise an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* beteiligt sind (Abschnitt 4.1). Einige dieser Proteine und Gene wurde in dieser Arbeit detaillierter untersucht, um deren Beteiligung an der Kälteanpassung zu klären. Die kälteinduzierten Gene *yjIC*, *yvyD*, *ybaE*, *ydhM*, *ysbA*, *ywaC*, *yshA* und *yscB* wurden durch Gendeletionen und anschließende Wachstumsanalyse nach einem Kälteschock charakterisiert, wobei sich allerdings herausstellte, dass die meisten Deletionsmutanten  $\Delta yvyD$  (JW1),  $\Delta ybaE$  (FW23),  $\Delta ydhM$  (FW24),  $\Delta ysbA$  (FW25),  $\Delta ywaC$  (FW26),  $\Delta yshA$  (FW27) und  $\Delta yscB$  (FW28) keinen Phänotyp bei niedrigen Temperaturen zeigten. Zwei Gründe können diese Beobachtungen erklären. Einerseits führt die Induktion dieser Gene auf Transkriptionsebene nicht zwangsweise auch zu einem erhöhten Proteinlevel in der Zelle. Eine zweite denkbare Möglichkeit bezieht sich auf die physiologische Komplexität des Organismus, der für ein kältespezifisches Problem oft mehrere parallele Mechanismen besitzt, so dass die Inaktivierung nur eines Systems noch keinen äußerlich sichtbaren Effekt in Form eines kältesensitiven Phänotyps erzeugt.

Als einziger Kandidat dieser Studie zeigte die Deletion von *yjIC* bei 15 °C ein verlangsamtes Wachstum. Allerdings weist die *yjIC* Deletionsmutante FW11 auch bei 37 °C einen Wachstumsdefekt auf. Demzufolge ist die Deletion dieses Genes ein generelles Problem für

*B. subtilis* und kann nicht in direkten Zusammenhang mit der Kälteanpassung gebracht werden.

#### 5.1.4 Ausblick

Für die Identifizierung neuer kälterelevanter Gene und Proteine, die an der Kälteanpassung von *B. subtilis* beteiligt sind, steht die Gruppe der unbekannten Gene und Proteine im Mittelpunkt der weiteren Untersuchungen. Sie können potentielle neue Kandidaten für eine Beteiligung an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* sein. Um diese Gruppe von Genen und Proteinen näher untersuchen zu können, müssen ihre Gemeinsamkeiten auf DNA- oder Proteinebene gefunden werden. Aufgrund dieser Sequenzähnlichkeiten können dann Kombinationsmutanten konstruiert werden, die wiederum in Wachstumsanalysen im Vergleich zum Wildtyp JH642 untersucht werden können. Dieser Ansatz könnte eine Möglichkeit bieten, die bereits angesprochenen parallelen Mechanismen (*back up*-Systeme) des *B. subtilis* zu identifizieren, durch die Kombinationsmutanten einen kältesensitiven Phänotyp zu erhalten und so die Kälterelevanz der Kombination dieser Gene und Proteine nachzuweisen.

Weiterhin könnten Vertreter der Y-Gene und -Proteine mit großen Homologien zu bekannten Systemen auf ihre Funktion hin durch biochemische Assays charakterisiert werden. So gibt es Ansätze, das stark kälteinduzierte Protein YlaG, das große Homologien zu bekannten GTP-bindenden Elongationsfaktoren aufweist, durch einen von der Arbeitsgruppe Hemmilä entwickelten nicht radioaktiven Assay als GTP-bindendes Protein zu charakterisieren (Frang *et al.*, 2003).

### 5.2 Anpassung der Zellmembran von *Bacillus subtilis* nach Kälteschock

Bei sinkender Umgebungstemperatur wird bei dem Gram-positiven Bodenbakterium *B. subtilis* eine Stressantwort ausgelöst, die sich primär in einer Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit äußert. Viele Proteine werden nach einem Kälteschock überhaupt nicht mehr synthetisiert, einige Proteine werden jedoch verstärkt produziert, um die Zelle an das Wachstum bei niedrigen Temperaturen anzupassen. Zu den Zellbestandteilen, die sich anpassen müssen, gehört die Membran, da sie das Zellinnere von den äußeren Bedingungen abgrenzt. Sinkende Temperaturen haben das Erstarren der bakteriellen Zellmembran und die Verlangsamung oder sogar den Stopp der damit gekoppelten essentiellen Funktionen zur



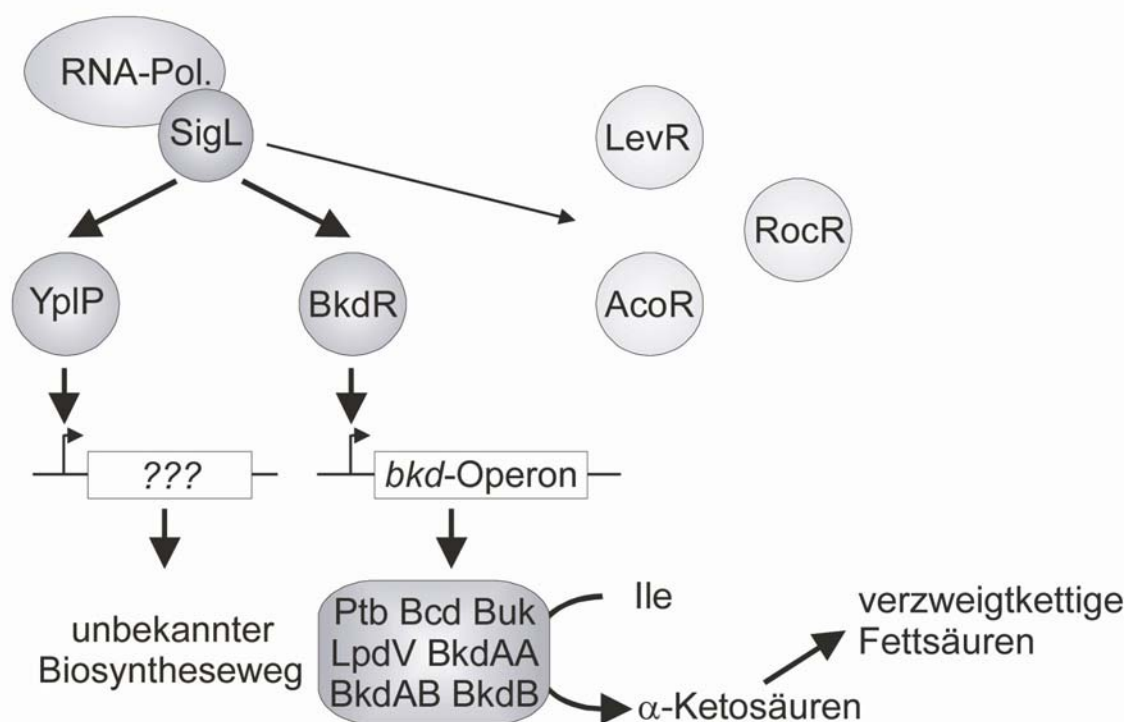
Folge. Die Zelle begegnet diesen fatalen Folgen der Temperaturniedrigung durch eine Anpassungsreaktion, indem sie die Beweglichkeit der Fettsäurereste in der Membran erhöht und damit deren Fluidität unter den veränderten Bedingungen konstant hält (Abschnitt 1.3.2). Die Membranfluidität kann sowohl durch die Neusynthese und Einführung verzweigtkettiger Fettsäurereste (Klein *et al.*, 1999) als auch durch die Einführung ungesättigter Fettsäurereste durch eine Desaturase (Aguilar *et al.*, 1998, Weber *et al.*, 2001) in bereits vorhandene Fettsäurereste angepasst werden. Die Desaturase wandelt dabei die bestehenden Fettsäurereste in  $\Delta^5$ -ungesättigte Fettsäuren um und steht dabei unter der exklusiven Kontrolle eines Zweikomponentensystems DesKR. Die Anpassung der Membran durch die Neusynthese verzweigtkettiger Fettsäuren verläuft über die Degradation von Isoleucin durch das *bkd*-Operon zu den Vorläufern der verzweigtkettigen Fettsäuren, den  $\alpha$ -Ketosäuren. Es beinhaltet sieben Gene und ist auf Transkriptionsebene hoch kälteinduziert (Kaan *et al.*, 2002). Das *bkd*-Operon wird durch den Transkriptionsaktivator BkdR und den korrespondierenden  $\sigma^L$ -Faktor reguliert (Debarbouille *et al.*, 1999). Dieser wurde in den Transkriptionsanalysen in Abschnitt 4.1.2 bereits als zwei- bis dreifach kälteinduziert nachgewiesen. In diesem Zusammenhang wurde bereits in früheren und auch in den Transkriptionsanalysen dieser Arbeit das Gen *yplP* als stark kälteinduziertes Gen mit zehnfacher Induktion gefunden. Es wies signifikante Homologien zu den  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren AcoR, BkdR, LevR und RocR auf und zeigte in Gendeletionsstudien mit anschließender Wachstumsanalyse einen kältesensitiven Phänotyp (Beckering *et al.*, 2002). Dies ließ auf eine mögliche Beteiligung der  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren mit dem  $\sigma^L$ -Faktor an der Kälteanpassung von *B. subtilis* schließen. Es wurden daher eingehende Untersuchungen dieser Gene und Genprodukte für die Kälteanpassung von *B. subtilis* durchgeführt.

### 5.2.1 $\sigma^L$ und die kälterelevanten Transkriptionsaktivatoren

Das Gen *sigL* kodiert für ein Protein, das homolog zu der  $\sigma^{54}$ -Untereinheit der RNA-Polymerase aus *E. coli* ist. Der  $\sigma^L$ -Faktor ( $\sigma^{54}$ ) benötigt zur Aktivierung der Transkription seiner Zielgene die Beteiligung von Regulatorproteinen, die homolog zur NtrC/NifA Familie aus *E. coli* sind (Buck *et al.*, 2000, Debarbouille *et al.*, 1991). In *B. subtilis* sind insgesamt fünf Homologe dieser Regulatorproteine bekannt. Vier dieser Proteine (AcoR, BkdR, LevR, RocR) sind bereits funktionell charakterisiert worden, wohingegen der fünfte Regulator YplP bisher noch nicht charakterisiert wurde. In früheren Deletionsstudien konnte die Kälterelevanz von YplP bereits gezeigt werden. Ebenso wurde

*ypIP* in DNA-Arrays als hoch kälteinduziertes Gen gefunden (Beckering *et al.*, 2002). Alle fünf Regulatoren besitzen sowohl die gut konservierte  $\sigma^{54}$ -Interaktionsdomäne als auch ein C-terminales DNA-Bindemotiv. Dagegen fehlt in YpIP die N-terminale Domäne, die in den anderen  $\sigma^L$ - ( $\sigma^{54}$ -) abhängigen Aktivatoren für die Signaltransduktion verantwortlich ist (Shingler, 1996). Dies könnte ein Indiz für eine vergleichsweise andere Regulation von YpIP sein.

Durch die in dieser Arbeit konstruierten Deletionsmutanten und die nachfolgende Analyse des Wachstumsverhaltens dieser Mutanten im Vergleich zum Wildtypstamm konnte eindeutig die große Kälterelevanz der Aktivatoren BkdR und YpIP, sowie des  $\sigma^L$ -Faktors nachgewiesen werden (**Abb. 4.2-6** Abschnitt 4.2.2.2). Ebenso konnten die früheren Ergebnisse von Beckering *et al.* auf Transkriptionsebene für *ypIP* (10,0x) bestätigt und darüber hinaus sogar die Induktion von *sigL* (2,5x) gezeigt werden (**Tab. 4.1-2** Abschnitt 4.1.2 und **Abb. 4.2-1** Abschnitt 4.2). Die Aktivatoren AcoR, LevR und RocR scheinen dagegen unter den Kälteschockbedingungen für den *B. subtilis* keine Rolle zu spielen. Schematisch ist die Kälterelevanz in der nachfolgenden **Abb. 5.2-1** illustriert.



**Abb. 5.2-1:** Schema der  $\sigma^L$ -abhängigen Transkriptionsaktivatoren BkdR und YpIP, welche mit der Kälteanpassung und den *downstream*-regulierten Genen verknüpft sind.

Wie aus dem Schema hervorgeht, war die Beteiligung von SigL mit BkdR zusammen für die Kälteanpassung von *B. subtilis* nicht ganz unerwartet. Sie aktivieren die Transkription der Gene des *bkd*-Operons, dessen Genprodukte für die Umsetzung von Isoleucin über die  $\alpha$ -Ketosäuren zu den verzweigtkettigen Fettsäuren verantwortlich sind (Debarbouille *et al.*, 1999). Dennoch konnte erst durch die Deletionsstudien dieser Arbeit die Kälterelevanz von BkdR und SigL für die Adaptation von *B. subtilis* nachgewiesen werden.

In früheren Untersuchungen wurde festgestellt, dass der *B. subtilis* Stamm JH642 einen Defekt im Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Fettsäuren aufweist (Klein *et al.*, 1999), die nach einem Kälteschock in die Membran eingebaut werden. Dieser kann durch Zugabe von Isoleucin zum Wachstumsmedium aufgehoben werden. Dieses Kenntnis sollte verwendet werden, um die Deletionsmutanten mit und ohne Isoleucin im Wachstumsmedium zu untersuchen. Dieses sollte die Beteiligung von BkdR und SigL an der Membrananpassung nach einem Kälteschock bestätigen und darüber hinaus eine mögliche Beteiligung von YpIP an der Membrananpassung zeigen. Die Phänotypen der Deletionsmutanten von *bkdR* und *sigL* konnten durch Zugabe von Isoleucin wieder auf das Niveau des Wildtyps angehoben werden. Der  $\sigma^L$ /BkdR-Komplex aktiviert das *bkd*-Operon. In früheren Untersuchungen zur Promotoraktivität des *bkd*-Operons konnte bereits gezeigt werden, dass BkdR für eine vollständige Induktion der Transkription des *bkd*-Operons notwendig ist. In einer *bkdR* Deletionsmutante wurde eine stark verringerte Promotoraktivität nachgewiesen (Debarbouille *et al.*, 1999). Dies lässt in der *bkdR* Deletionsmutante auf eine verringerte Transkription des *bkd*-Operons und demnach auf eine geringere Menge an *bkd*-Enzymen in der Zelle schließen. Dieser Basallevel an *bkd*-Enzymen scheint demnach dafür verantwortlich zu sein, dass die *bkdR* Deletionsmutante durch eine erhöhte Isoleucinkonzentration genügend  $\alpha$ -Ketosäuren produzieren kann. Diese dienen dann ihrerseits als Substrate für die Synthese von verzweigtkettigen Fettsäuren. So kann das Wachstumsverhalten der *bkdR* Deletionsmutante auf das Niveau des Wildtyps verbessert werden (**Abb. 4.2-7** Abschnitt **4.2.2.2**). Die hohe Substratkonzentration (Isoleucin) kompensiert demnach die verringerte Menge an Enzym. Diese Beobachtung lässt sich in gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Klein *et al.* bringen, der Isoleucin als „Schalter“ für die verzweigtkettige Fettsäuresynthese bei niedrigen Temperaturen beschrieb (Klein *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu lässt sich in der Deletionsmutante von *ypIP* durch Zugabe eines Überschusses an Isoleucin das Wachstum nicht auf Niveau des Wildtyps verbessern. Daraus lässt sich schließen, dass der  $\sigma^L$ /YpIP-Komplex kein Element reguliert, das an der Membrananpassung beteiligt ist.

Die Identifizierung der vom  $\sigma^L$ /YpLP-Komplex regulierten Gene sollte im Weiteren vorgenommen werden. Hierzu wurde in der Deletionsmutante von *yplP* mittels genomweiter Transkriptionsanalyse auf nicht mehr kälteinduzierte Gene gesucht. Des Weiteren wurde auch das Chromosom von *B. subtilis* auf  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnliche Promotoren hin untersucht. Hieraus ergaben sich die folgenden Kandidaten: *ydhMNO* (DNA-Array), *acoA*, *rocA*, *levD*, *rocD*, *ptb*, *yfmN*, *yhaG*, *ispA*, *ykpC*, *argS* (Sequenzsuche). Alle diese Kandidaten wurden durch biochemische Untersuchungen in Form von EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) analysiert. Durch den EMSA von SigL und BkdR mit der bekannten Promotor-DNA des *bkd*-Operons konnte an dieser Stelle zum ersten Mal *in vitro* gezeigt werden, dass sowohl BkdR als auch SigL alleine an die Promotor-DNA binden können. Ebenso kann diese auch durch beide Enzyme im Gemisch vollständig im EMSA geshiftet werden (**Abb. 4.2-13** Abschnitt 4.2.4.5). Der  $\sigma^L$ /BkdR-Komplex wurde somit als „Mastersystem“ zur Etablierung des Assays verwendet und dieses auf  $\sigma^L$ /YpLP übertragen.

Die Bedingung für einen vollständigen Shift im EMSA der Promotor-DNA durch den  $\sigma^L$ -Faktor zusammen mit einem Regulator ist demnach das Vorhandensein der  $\sigma^L$ -Interaktionsdomäne und des C-terminalen DNA-Bindemotivs im Regulator. Über die DNA-Bindedomäne wird die Interaktion des Regulators zur DNA hergestellt und mittels der  $\sigma^L$ -Interaktionsstelle wird mit SigL interagiert. Für die Bindung von SigL an die DNA ist ein  $\sigma^L$ -Promotor notwendig. Diese Bedingungen müssen alle erfüllt sein, damit ein Shift im EMSA zu beobachten ist.

Aus diesem Grund wurden neben dem aus den DNA-Arrays hervorgegangenem *ydhM*-Operon, das keinen konservierten  $\sigma^L$ -Promotor aufweist (**Abb. 4.2-11** Abschnitt 4.2.4.3), auch die  $\sigma^L$ - und  $\sigma^L$ -ähnlichen Promotoren von *acoA*, *rocA*, *levD*, *rocD*, *ptb*, *yfmN*, *yhaG*, *ispA*, *ykpC*, *argS* durch EMSA untersucht. Die EMSAs zeigten für alle Kandidaten keinerlei Interaktion mit dem  $\sigma^L$ /YpLP-Komplex. Nur die  $\sigma^L$ -Promotor-DNA-Sequenzen von *acoA*, *levD*, *ptb*, *rocA* und *rocD* zeigten eine Interaktion mit SigL, jedoch nicht mit YpLP oder SigL und YpLP zusammen.

Daraus lässt sich nur schlussfolgern, dass der  $\sigma^L$ /YpLP-Komplex andere Gene als die bisher untersuchten aktiviert. Um jedoch diese identifizieren zu können, müssen andere Experimente durchgeführt werden. Als erstes muss nachgewiesen werden, dass SigL und YpLP interagieren können und so die aus dem Sequenzvergleich identifizierte  $\sigma^L$ -Interaktionsdomäne ihre postulierte Funktion erfüllt. Dieses würde sich durch die Biacore-Methode realisieren lassen. Hierbei wird eines der zwei Proteine kovalent an eine Goldmatrix gebunden und der zu

untersuchende Analyt, in diesem Fall das zweite Protein, über diese Goldmatrix geleitet. Durch Messung der Veränderung des SPR-Signals (*surface plasmon resonance*) kann ein Bindungsprofil aufgenommen werden, das Aufschluss über Assoziations- und Dissoziationskonstanten des Analyten zum matrixgebundenen Protein gibt. Im Weiteren könnten auch durch eine Strukturaufklärung von YpIP nähere Informationen erhalten werden, die ebenfalls mit den Ergebnissen des Sequenzvergleiches verglichen werden können. Strukturelle Information ermöglichen oft zusätzliche und detaillierte Rückschlüsse auf die Funktion einzelner Domänen in einem Protein.

### 5.2.2 Defekt in der Biosynthese verzweigter Fettsäuren von *B. subtilis* JH642

Die Membran kann über zwei voneinander unabhängige Systeme nach einem Kälteschock angepasst werden. Diese Anpassung erfolgt zum einen über die Neusynthese von verzweigtkettigen Fettsäuren und zum anderen über die Einführung von ungesättigten Fettsäuren. Um die beiden Systeme unabhängig voneinander untersuchen zu können, muss jeweils ein System ausgeschaltet werden. So wurde zur Untersuchung der Membrananpassung durch ungesättigte Fettsäuren ein Stamm verwendet, in dem die Synthese von verzweigtkettigen Fettsäuren defekt ist. Dieser Defekt war in seiner Wirkung bereits bekannt, jedoch seine Ursache nicht. In dieser Arbeit konnte die Ursache für diesen Defekt aufgeklärt werden.

Die Anpassung der Membran über die Einführung ungesättigter Fettsäurereste durch die Desaturase *Des* wurde daher in dem *B. subtilis* Stamm JH642 untersucht, der einen bis jetzt nicht charakterisierten Defekt in der Biosynthese verzweigtkettiger Fettsäuren aufweist (Klein *et al.*, 1999). In Deletionsstudien zur Desaturase wurde nur in diesem Stamm ein kältesensitiver Phänotyp beobachtet (Weber *et al.*, 2001). Mit einem funktionierenden Biosyntheseweg der verzweigtkettigen Fettsäuren würde die Deletion von *des* in Wachstumsanalysen keinen Phänotyp erzeugen (Aguilar *et al.*, 1998). Die Identifizierung dieses uncharakterisierten Defekts wird nachfolgend beschrieben und orientierte sich an den Vorarbeiten von Klein *et al.*.

Diese Vorarbeiten zeigten einen kältesensitiven Phänotyp des Wildtypstammes JH642. Der Wildtypstamm JH642 beginnt nach fünf bis sieben Stunden nach Kälteschock zu lysieren, während der Wildtypstamm MR168, der den beschriebenen Defekt nicht aufweist, weiterhin fähig ist unter 15 °C-Bedingungen zu wachsen (**Abb. 4.3-1** Abschnitt 4.3). Klein *et al.* haben gezeigt, dass die Zugabe von Threonin, Isoleucin und Zwischenprodukten auf dem Weg zu

den anteiso-verzweigten Fettsäuren eine kälteprotektive Funktion für den Stamm JH642 hat. Threonin als direkter Vorläufer von Isoleucin hat die gleichen protektiven Eigenschaften wie Isoleucin. Mutanten, die einen Defekt in der Biosynthese von Isoleucin hatten, zeigten einen kältesensitiven Phänotyp. Dieses weist auf die Wichtigkeit eines funktionierenden Biosyntheseweges von Threonin zu Isoleucin hin. Klein *et al.* postulierten aufgrund dieser Ergebnisse, dass der uncharakterisierte Defekt des Stammes JH642 oberhalb des Threonins, demnach im Biosyntheseweg von Oxalacetat zu Threonin, lokalisiert sein müsste.

In dieser Arbeit wurden weitere Überlegungen zur Lokalisierung des Defekts angestellt. Es wurde vermutet, dass der Defekt auch unterhalb des Threonins lokalisiert sein könnte. Dabei kann es sich entweder um ein Enzym handeln, das in zu geringen Mengen in der Zelle vorliegt, oder um ein defektes mit geringerer Effizienz arbeitendes Enzym. Da die von Klein *et al.* durchgeführten Wachstumsexperimente immer mit 100  $\mu\text{M}$  Threonin bzw. Isoleucin durchgeführt wurden, obwohl auch eine minimale Menge an Isoleucin von 20  $\mu\text{M}$  ausgereicht hätte, würde sich in beiden Fällen durch den Überschuss an Threonin genug Zwischenprodukte für die Membrananpassung nach einem Kälteschock bilden können und so den Defekt überdecken. Für die Klärung der Lokalisierung des Defekts wurden alle Gene mit ihren Promotorregionen, deren Genprodukte für die Umsetzung von Threonin über Isoleucin zu den  $\alpha$ -Ketosäuren verantwortlich sind, in beiden Wildtypstämmen JH642 und MR168 sequenziert. Hierbei wurde **nur** im Gen *ilvB* ein Unterschied in beiden Stämmen gefunden (**Abb. 4.3-3** Abschnitt **4.3.1**). Dieser Unterschied zwischen dem MR168 und dem JH642 bringt auf Proteinebene eine Aminosäuremutation an Position 176 von Lysin zu Glycin mit sich.

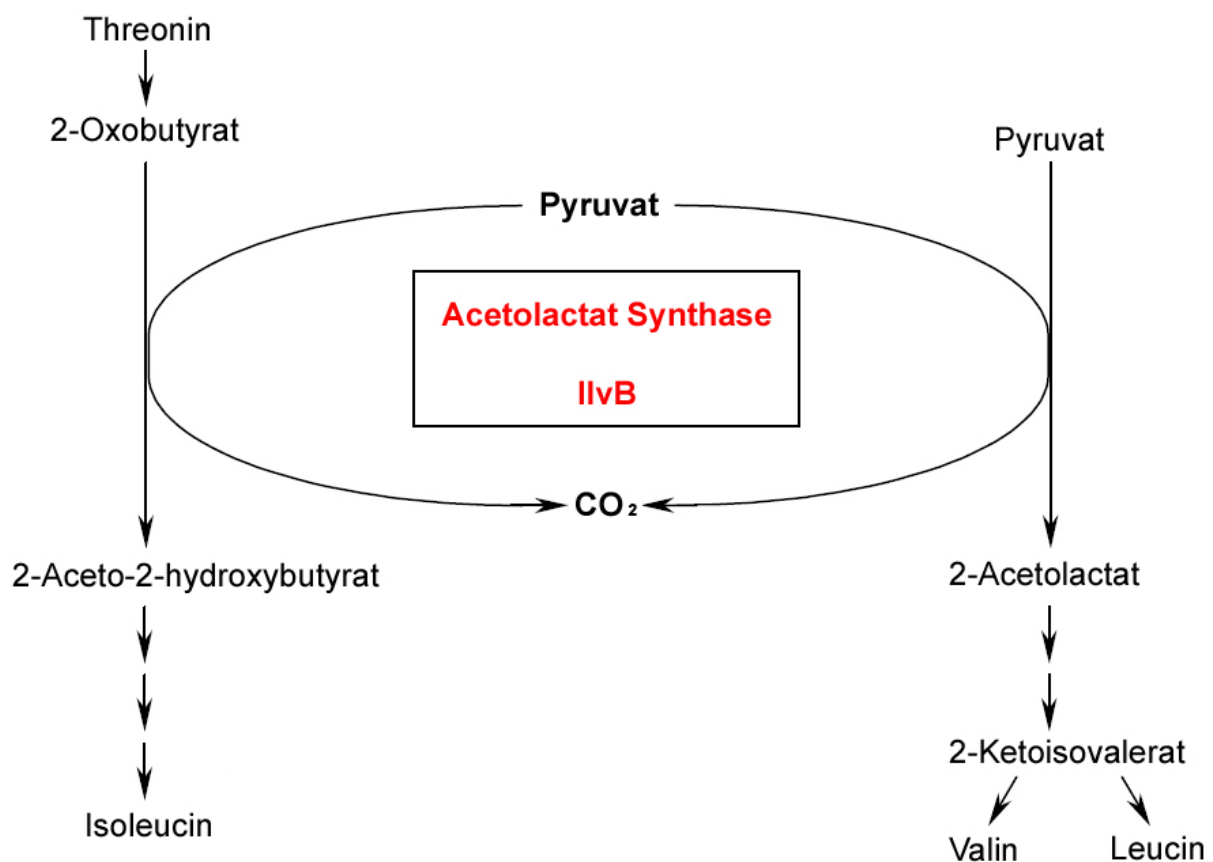
Bei dem Genprodukt von *ilvB* handelt es sich um eine Untereinheit des Acetolactat Synthase-Komplexes (ALS-Komplex) aus *B. subtilis*. Der ALS-Komplex katalysiert den ersten allgemeinen Schritt des gegabelten Biosyntheseweges zu den verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin. Dabei katalysiert der ALS-Komplex sowohl die Kondensation zweier Moleküle Pyruvat zu einem Molekül 2-Acetolactate in der Valin- und Leucin-Biosynthese, als auch die Bildung von 2-Aceto-2-hydroxybutyrat aus Pyruvat und 2-Oxobutyrate in der Biosynthese von Isoleucin.

Um zu überprüfen, ob die gefundene Mutation im Gen *ilvB* für den Defekt des JH642 verantwortlich ist, wurden zum einen *in trans* Komplementationsstudien *in vivo* durchgeführt (Abschnitt **4.3.2**) und zum anderen die katalytische Effizienz der ALS-Komplexe aus JH642 und MR168 *in vitro* bestimmt (Abschnitt **4.3.4**).

Das Komplementationsexperiment zeigte durch die *in trans* Integration der für den ALS-Komplex aus dem Stamm MR168 kodierenden Gene in den Wildtypstamm JH642 ein verbessertes Wachstum dieses Stammes (**Abb. 4.3-4b** Abschnitt 4.3.2). Dieses ist ein erster Hinweis, dass die Mutation im Gen *ilvB* des Stammes JH642 tatsächlich für das unterschiedliche Wachstum der beiden Wildtypen MR168 und JH642 in der Kälte verantwortlich sein könnte.

Im Weiteren wurden die ALS-Komplexe aus MR168 und JH642 heterolog produziert und auf ihre Produktbildungsgeschwindigkeiten hin getestet. Auch hier zeigte sich ein erheblicher Unterschied zwischen den Enzymen der beiden Wildtypstämme (**Abb. 4.3-8** Abschnitt 4.3.4). Der Acetolactat Synthase-Komplex aus MR168 wies mit 55,7  $\mu\text{M}/\text{min}$  eine 51-fach schnellere Produktbildungsgeschwindigkeit auf als der ALS-Komplex aus JH642 mit nur 1,1  $\mu\text{M}/\text{min}$ . Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass der Stamm JH642 im Biosyntheseweg des Isoleucins im Protein IlvB einen Defekt aufweist.

Die Lokalisierung des charakterisierten Defekts im Biosyntheseweg zu den verzweigten Aminosäuren ist abschließend noch einmal im nachfolgenden Schema dargestellt (**Abb. 5.2-2**).



**Abb. 5.2-2:** Lokalisierung des Defekts im Biosyntheseweg zu den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin

Wie die **Abb. 5.2-2** zeigt ist die Acetolactat Synthase zentral in der Synthese von Isoleucin, Leucin und Valin beteiligt. Diese zentrale Position macht sie für eine Mutation insofern anfällig, dass hierdurch die Biosynthese der verzweigtkettigen Aminosäuren erheblich gestört werden kann. Der entdeckte Defekt in *IlvB* hat demnach eine starke Auswirkung auf den *Bacillus subtilis* JH642. Nach einem Kälteschock werden verstärkt verzweigte Aminosäuren benötigt. Diese werden durch die vom *bkd*-Operon kodierten *bkd*-Enzyme zu den verzweigten  $\alpha$ -Ketosäuren umgewandelt und dienen selber als Substrate für die Synthese der anteiso-verzweigten Fettsäuren, die *de novo* in die Membran eingebaut werden (**Abb. 5.2-1**).

Durch den Defekt in der Acetolactat Synthase (ALS) des Stammes JH642 und der damit verbundenen 51-fach verringerten Effizienz der ALS werden nicht mehr ausreichende Mengen an kälteprotektivem Isoleucin synthetisiert. Diese verringerte Menge an Isoleucin führt zu einem Mangel an verzweigtkettigen Fettsäuren. Dieses Defizit kann der Stamm JH642 fünf bis sieben Stunden nach Kälteschock nicht mehr ausgleichen und beginnt zu lysieren (**Abb. 4.3-1** Abschnitt 4.3).



## 6. Anhang

### 6.1 Primer

Die *kursiv+fett* dargestellten Basen bezeichnen die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Die **unterstrichenen+fett** Basen zeigen entweder die Sequenz des T7 Promotors oder den zu den Resistenzkassetten homologen Bereich von Primern für PCR-*knock outs* an. Die entsprechende Resistenzkassette ist dann hinter den Primern vermerkt.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Verhältnis Gesamt/GC- Gehalt	Schmelztemp.
5'- <i>acoR</i>	GCT TTA TTT TTC CCC TAC AAT	21/7	52 °C
3'- <i>acoR</i>	TAC ATA ACG TTT CCA TTT CCT	21/7	52 °C
<i>yvyD_P1</i>	TAT GTA ACA GAT TTT CGC GAT GCT TGG AAA	30/11	62,7 °C
<i>yvyD_P2</i> (3'- <i>kan</i> )	<u><b>CGA GCT CGA ATT CGT</b></u> <u><b>AAT CAT GGT CAT A</b></u> AAC GCC TCC CTT TTA TTA AGG ATA TGT ATC <u><b>GTA TAA TCT TAC CTA</b></u> <u><b>TCA CCT CAA ATG GTT</b></u>	30/11	62,7 °C
<i>yvyD_P3</i> (5'- <i>kan</i> )	CGC GGA AGG TTT TTG TTT TTC TTA TTT GCA	30/11	62,7 °C
<i>yvyD_P4</i>	CTT CTT CAG TAA GCT GTA CAG CTT TTG TTT	30/11	62,7 °C
<i>yjIC-P1</i>	TAT TCG GTA TCA TGC AGA TCA ATG GAA TCA	30/11	62,7 °C
<i>yjIC-P2</i> (3'- <i>kan</i> )	<u><b>CGA GCT CGA ATT CGT</b></u> <u><b>AAT CAT GGT CAT A</b></u> TAA GCA GTT TGC TGA TTT TTT TGG AAA GGG	30/11	62,7 °C
<i>yjIC-P3</i> (5'- <i>kan</i> )	<u><b>GTA TAA TCT TAC CTA</b></u> <u><b>TCA CCT CAA ATG GTT</b></u> CAA ATT GAT ATA AAG GAC GGA GGA TAT ACG	30/11	62,7 °C
<i>yjIC-P4</i>	AGC AAC GAA TAC ATC TTC ATG AGA TGT AGA	30/11	62,7 °C
5'- <i>bkdR</i>	ATT GCA ACG GAA TAA ATA GGT	21/7	52 °C
3'- <i>bkdR</i>	ATG TTT GCG TTT ATT CTG CAA	21/7	52 °C
5'- <i>bkdR</i> ( <i>SpeI</i> )	TAT <b>ACT AGT</b> ATT GCA ACG GAA TAA ATA GGT	21/7	52 °C

3'- <i>bkdR</i> ( <i>Bam</i> HI)	TAT <b>GGA TCC</b> ATG TTT GCG TTT ATT CTG CAA	21/7	52 °C
5'- <i>sigL2</i> ( <i>Nco</i> I)	TAT <b>CCA TGG</b> ATA TGA AAC TTC AGC AA	21/7	52 °C
3'- <i>sigL</i> ( <i>Spe</i> I)	TAT <b>ACT AGT</b> TTT ATA TCG CTT TCT CGC TG	21/8	54 °C
5'- <i>yplP</i> ( <i>Nco</i> I)	TAT <b>CCA TGG</b> ATA GTG CAC CAA AAC TCA ATA	25/9	58,1 °C
3'- <i>yplP</i> ( <i>Spe</i> I)	TAT <b>ACT AGT</b> GAT CAT TTG ATT TTT TAA CGT CTC	21/7	52 °C
5'- <i>bkdR</i> ( <i>Nco</i> I)	TAT <b>CCA TGG</b> AAA AGG TAC TGA TAG TAG GTG	25/10	59,7 °C
3'- <i>bkdR</i> ( <i>Spe</i> I)	TAT <b>ACT AGT</b> TTG CAT GCC TTC ATT TGC AA	21/8	54 °C
5'- <i>bkdRop1.1</i>	CCC TTT ATC TTT TCA TTT CCT	21/7	52 °C
3'- <i>bkdRop1.2</i>	ATA AAC GATGCC CAT TTC GT	20/7	51,2 °C
5'- <i>bkdRop2.1</i>	TTA TTC ACA AGA CTG CGA TAT	21/7	52 °C
3'- <i>bkdRop2.2</i>	TCG TTC CAT TTC TTC TTT CAT	21/7	52 °C
5'- <i>bkdRop3.1</i>	AGC GCT TGA TTA TGT TTA TG	20/7	51,2 °C
3'- <i>bkdRop3.2</i>	TAT CGA GTC GAA ATG AAA ATA C	22/7	52,8 °C
5'- <i>yplP</i> Sonde	AGC TTC CTG TCT TAA TAA CAG	21/8	54 °C
3'- <i>yplP</i> Sonde+T7	<b>TAA TAC GAC TCA CTA</b> <b>TAG GG</b> TTG CTG TGT TCA GAA ATG ATC	21/8	54 °C
5'- <i>sigL</i> Sonde	AAA ACT CCA GTC GTC GTT AGA AC	23/10	58,9 °C
3'- <i>sigL</i> Sonde+T7	<b>TAA TAC GAC TCA CTA</b> <b>TAG GG</b> AAA TCC TTT TGG CGT GTG AT	20/8	53,2 °C
5'- <i>sigL</i> _Seq1	GAT TTT ATC CTC AGA CTG ATT	21/7	52 °C
3'- <i>sigL</i> _Seq2	GTC TGT ATC ATC ACC TTT TT	20/7	51,2 °C
5'- <i>ilvA</i> _Seq1	AGC TAT CAA TCC TCT TTT TTG	21/7	52 °C
3'- <i>yplP</i> _Seq2	TGA TTA GAA ACA CTA ATG CTG	21/7	52 °C
5'- <i>ilvB</i> _Seq1	AAA GCG GAT AGA AAT ATC CAT	21/7	52 °C
3'- <i>ilvC</i> _Seq2	AAG TTT CTC CTG TGT ATT CA	20/7	51,2 °C
5'- <i>ilvD</i> _Seq1	CAA TAT TAA TAG TTG GAG GGT	21/7	52 °C
3'- <i>ilvD</i> _Seq2	GAA GTA AAG GAT ACT ATA GAG	21/7	52 °C

5'- <i>fabH1</i> _Seq1	TTC TTG AAA ACA CAT CCA ACT	21/7	52 °C
3'- <i>fabH1</i> _Seq2	TTG ATT GCG TTA TTC CAA CTT	21/7	52 °C
5'- <i>fabH2</i> _Seq1	AAT GCC AAA AAG ACT ACT GC	20/8	53,2 °C
3'- <i>fabH2</i> _Seq2	AGA AAC ATC AGA AGA ACA GC	20/8	53,2 °C
5'- <i>ptb</i> _shift	GTC AGC ATT CGG AAT TTA TAT	21/7	52 °C
3'- <i>ptb</i> _shift	TTA AGC AAA ACA GAA GTC GG	20/8	53,2 °C
<i>ilvB</i> _kompl_P1	GTT ATT TCA GGC CCT CTT AGT TTT TCT AGA	30/11	62,7 °C
<i>ilvB</i> _kompl_P2 (3'- <i>kan</i> )	<b><u>CGA GCT CGA ATT CGT</u></b> <b><u>AAT CAT GGT CAT A</u></b> CAG CTG TTC AAG AAG GTC GTT TGT TTT TCA	30/12	64 °C
<i>ilvB</i> _kompl_P3 (5'- <i>kan</i> )	<b><u>GTA TAA TCT TAC CTA</u></b> <b><u>TCA CCT CAA ATG GTT</u></b> AGT AGC CTT GAT AAA GTT TTC CAC AGA GAA	30/11	62,7 °C
<i>ilvB</i> _kompl_P4	CGT TCT TCA TAG AAA ATT TCC TGC CAC TGT	30/12	64 °C
5'- <i>ilvB</i> _Pro_Seq1	AAT GGA TTG CAA GAT GAT CT	20/7	51,2 °C
3'- <i>ilvB</i> _Pro_Seq2	AGC TAG ATA GCT GAT TAT TC	20/7	51,2 °C
5'- <i>ilvB</i> _amy2 ( <i>SpeI</i> )	TAT <b>ACT AGT</b> TAA TCA GCT ATC TAG CTA ATG	21/7	52 °C
3'- <i>ilvB</i> _amy3 ( <i>BamHI</i> )	TAT <b>GGA TCC</b> CTC CCT TGT TAT GTT TTA TAC	21/7	52 °C
5'- <i>ilvB</i> _Expression ( <i>NcoI</i> )	TAT <b>CCA TGG</b> GGA CTA ATG TAC AGG	19/9	54,5 °C
3'- <i>ilvB</i> _Expression ( <i>BamHI</i> )	TAT <b>GGA TCC</b> AGG TTT CAC CCC CAC CA	17/10	55,2 °C
5'- <i>ilvH</i> _Expression ( <i>NcoI</i> )	TAT <b>CCA TGG</b> AA AGA ATT ATC ACA TTG ACT	20/5 - 24/8	47,1 °C - 55,9 °C
3'- <i>ilvH</i> Exprichtig ( <i>BamHI</i> )	TAT <b>GGA TCC</b> TAC AAT AGA TAT TGT TTT ATT GGA TGA C	21/7	52 °C
5'- <i>levR</i>	GTT AAT GGC TTA TCT AAT AAG G	22/7	52,8 °C
3'- <i>levR</i>	ACC TGT ATT AAA ATG GTG TTC	21/7	52 °C
5'- <i>rocR</i>	CAA TAA ACA AGA CAT TCT CTT C	22/7	52,8 °C
3'- <i>rocR</i>	CAT TGG CAT CAA TTC AAT GAA	21/7	52 °C
5'- <i>yplP</i> ( <i>SpeI</i> )	TAT <b>ACT AGT</b> AGG AGG CCA ATT GAT GAA TAG TGC AC	20/8 - 21/9	53,2 °C - 55,9 °C
3'- <i>yplP</i> ( <i>BamHI</i> )	TAT <b>GGA TCC</b> AAG TAC ATT CTC CTT TCG ATC	21/8	54 °C

3'- <i>ypI</i> Q ( <i>Bam</i> HI)	TAT <b>GGA TCC</b> TTA CTG TTA CGA AAG GAA AGG	21/8	54 °C
5'- <i>rocA</i>	TCT TAT TTT GAA TGG GTG CAA	21/7	52 °C
3'- <i>rocA</i>	TAA AAT CGG TAA ATG GTT CGT	21/7	52 °C
5'- <i>acoA</i>	GAA AAG GGA TAT ACA TAC TCA	21/7	52 °C
3'- <i>acoA</i>	TTC ATG CAC TTT GTC TTC AAA	21/7	52 °C
5'- <i>levD</i>	TTG ATC AAA GTC ATT ATG CAC	21/7	52 °C
3'- <i>levD</i>	TTA ATG CTA TGG GAA AAT CTC	21/7	52 °C
5'- <i>rocD</i>	TTT TAT TCA AGA CGT CAT GCT	21/7	52 °C
3'- <i>rocD</i>	TAA TGA GAC GTC TGA TCA ATA	21/7	52 °C
5'- <i>yhaG</i>	ACA TTT GCG ATT TAT ATG CTG	21/7	52 °C
3'- <i>yhaG</i>	AAA CAG AGC CAT AAT GAC TAA	21/7	52 °C
5'- <i>yfmN</i>	TTA TTA CAT GTA TCG TTG TCG	21/7	52 °C
3'- <i>yfmN</i>	AGA GCG TTT CTA AAC ATT TCT	21/7	52 °C
5'- <i>ykpC</i>	TTA TGC TTC AAT CCA ACG AAA	21/7	52 °C
3'- <i>ykpC</i>	CCA AGA ATA ATT CCG CTT AAA	21/7	52 °C
5'- <i>ispA</i>	ACA TAC ATG TAA TTC AGA TGC	21/7	52 °C
3'- <i>ispA</i>	GTG TCT AAT ACA GCA ACT TTA	21/7	52 °C
5'- <i>argS</i>	CCG GAT TTT ACT ATG TAA AAC	21/7	52 °C
3'- <i>argS</i>	GTG TTT CTA AAA CAA CAT TGG	21/7	52 °C
<i>ilvB</i> -P1	AAA TTG CTG TCC GTA AAA TCC TGA AGC GTA	30/12	64 °C
<i>ilvB</i> -P2 (3'- <i>kan</i> )	<b><u>CGA GCT CGA ATT CGT</u></b> <b><u>AAT CAT GGT CAT A</u></b> GCA CAG CCC CGC CCG GAT AAC CGA AGA TCA	30/11	62,7 °C
<i>ilvB</i> -P3 (5'- <i>kan</i> )	<b><u>GTA TAA TCT TAC CTA</u></b> <b><u>TCA CCT CAA ATG GTT</u></b> AAA GGA AAA GCT GGA AGA GGC ATT AAC ATC	30/12	64 °C
<i>ilvB</i> -P4	GCA CGT TAA ATC CAT GAG CGA ATA CTA ATG	30/12	64 °C
5'- <i>ydhM</i> _shift	AGA TTG CTA AGG AAG AAA ACA	21/7	52 °C

3' <i>ydhM</i> _shift	ACC AAT AAA CTG GTA GAC ATT	21/7	52 °C
<i>ybaE</i> _P1	GCA ACT TTT AAT AGA GAG AAA AGC AGA GCA	30/11	62,7 °C
<i>ybaE</i> _P2 (3'- <i>kan</i> )	<b><u>CGA GCT CGA ATT CGT</u></b> <b><u>AAT CAT GGT CAT A</u></b> CTG ATA GCG ATG CTC TAC ATC TTT AAT TGT <b><u>GTA TAA TCT TAC CTA</u></b> <b><u>TCA CCT CAA ATG GTT</u></b>	30/11	62,7 °C
<i>ybaE</i> _P3 (5'- <i>kan</i> )	TG ATG GAC AGC ATG ATT ATC GGC AAG TAT	29/12	63,9 °C
<i>ybaE</i> _P4	AA TTC TGT CTT TTG ACT TAT GCA GGA CAG	29/11	62,4 °C
<i>ydhM</i> _P1	TTT TCA GAT TAC CGA TCG TCT TGA GTT GTT	30/11	62,7 °C
<i>ydhM</i> _P2 (3'- <i>kan</i> )	<b><u>CGA GCT CGA ATT CGT</u></b> <b><u>AAT CAT GGT CAT A</u></b> CCC CCT GTT ATT AAA ACG CTT ACA TTG ATT <b><u>GTA TAA TCT TAC CTA</u></b> <b><u>TCA CCT CAA ATG GTT</u></b>	30/11	62,7 °C
<i>ydhM</i> _P3 (5'- <i>kan</i> )	ATG GAA CAG ATG AAA ATC ACG AAT TTA ACA GG	32/11	63,1 °C
<i>ydhM</i> _P4	CAC CAT TAC GTT AAT CAG CAA AAA TAC AGT C	31/11	62,9 °C
<i>ysbA</i> _P1	TGT TAA TAG TTG ATG ATG AGA TGC TGG CAA	30/11	62,7 °C
<i>ysbA</i> _P2 (3'- <i>mls</i> )	<b><u>ACA CCG CCA TAA ACT</u></b> <b><u>ATC ATA TCT TCT TTT</u></b> <b><u>TG</u></b> CCT CTT TCT CTT TGG TAC CCT CAT TAT AAA	30/11	62,7 °C
<i>ysbA</i> _P3 (5'- <i>mls</i> )	<b><u>ATG TCT CAT TCA ATT</u></b> <b><u>TTG AGG GTT GCC AGA</u></b> TTC ACA TGG AAA GCA CAA TGA GTC CTT ATT	30/11	62,7 °C
<i>ysbA</i> _P4	CTC ATC TAA TAG TCA AGA TCC ACC ATC TT	29/11	62,4 °C
<i>yscB</i> _P1	TGA GTT TTC ATT TTT GGC ATG GGA TTT CCT	30/11	62,7 °C
<i>yscB</i> _P2 (3'- <i>mls</i> )	<b><u>ACA CCG CCA TAA ACT</u></b> <b><u>ATC ATA TCT TCT TTT</u></b> <b><u>TG</u></b> CTC CTT ATA TCG GTC AGA GAT TAA CTT TGT	30/11	62,7 °C
<i>yscB</i> _P3 (5'- <i>mls</i> )	<b><u>ATG TCT CAT TCA ATT</u></b> <b><u>TTG AGG GTT GCC AGA</u></b> GAT CCC GAA GAC GCA CCA TAA AAT AAA AA	29/11	62,4 °C
<i>yscB</i> _P4	CTG ATC GGA TTT TTA TTT GTT CCA TCA GGT	30/11	62,7 °C
<i>ywaC</i> _P1	TTT TAT GTG AAG GTT GAT CTG CTG CTG TTT	30/11	62,7 °C
<i>ywaC</i> _P2 (3'- <i>kan</i> )	<b><u>CGA GCT CGA ATT CGT</u></b> <b><u>AAT CAT GGT CAT A</u></b> GTT CGT CAT CTC CTT TAA CGG AAC TTT AT	29/11	62,4 °C

<i>ywaC</i> _P3 (5'- <i>kan</i> )	<b>GTA TAA TCT TAC CTA</b> <b>TCA CCT CAA ATG GTT</b> ATC TTC AAA AAT GTC AGA TGC TTT CGC CTT	30/11	62,7 °C
<i>ywaC</i> _P4	AGA CCT GAC TTA TTA CGA GAA AGC CAA AAA	30/11	62,7 °C
<i>yshA</i> _P1	GCG CGT GAT AGT TTA TCC ATT TCC ATT AAA	30/11	62,7 °C
<i>yshA</i> _P2 (3'- <i>mls</i> )	<b>ACA CCG CCA TAA ACT</b> <b>ATC ATA TCT TCT TTT</b> <b>TG</b> TCC ATT CCG CGA GAA TCC TAG TTC TTA T	28/12	63,7 °C
<i>yshA</i> _P3 (5'- <i>mls</i> )	<b>ATG TCT CAT TCA ATT</b> <b>TTG AGG GTT GCC AGA</b> TGC TAG ATA TCA TCA TCT TAA TCT TGC TCC	30/11	62,7 °C
<i>yshA</i> _P4	CGA GCT CTT TAT ACA GCT TTG CGA TTT TTT	30/11	62,7 °C
5' <i>kan</i> 783( <i>Cla</i> I)	ATA <b>ATC GAT</b> AGG TGA TAG GTA AGA TTA TAC	21/7	52 °C
3' <i>kan</i> 783( <i>Sac</i> II)	TTA <b>CCG CCG</b> TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTC	21/7	52 °C
<i>yplP</i> -455( <i>Eco</i> RI)	ATA <b>GAA TTC</b> TTT CAT TTT ATG ATA AGC CCC	21/7	52 °C
<i>yplP</i> +1475( <i>Eco</i> RI)	TAT <b>GAA TTC</b> TCA GTG AAG CAT ATA AAG GTT	21/7	52 °C
<i>sigL</i> _P1	TAT TAT CAA GGC TTT AGA GAG AAA ATC GTC	30/10	61,3 °C
<i>sigL</i> _P4	ATG TTT TGT CAG CTC TTG TTT CAA TGG CT	29/11	62,4 °C

## 6.2 Deletionsmutanten von *Bacillus subtilis*

In der nachfolgenden Tabelle sind alle konstruierten Mutanten mit Funktion der deletierten Gene und Phänotyp aufgelistet, die im Bereich der Kälteanpassung von *Bacillus subtilis* untersucht wurden.

Nr.	Name	Stamm	Funktion	Phänotyp
1.	$\Delta cspB$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
2.	$\Delta cspC$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
3.	$\Delta cspD$	JH642	Hauptkälteschockprotein	-
4.	$\Delta ydbR$ ( $\Delta cshA$ )	JH642	RNA-Helikase	-
5.	$\Delta yqfR$ ( $\Delta cshB$ )	JH642	RNA-Helikase	-
6.	$\Delta ydbR$ $\Delta yqfR$ ( $\Delta cshA$ $\Delta cshB$ )	JH642	RNA-Helikasen	+
7.	$\Delta ydbR$ $\Delta cspB$ ( $\Delta cshA$ $\Delta cspB$ )	JH642	CSP/Helikasen	+
8.	$\Delta ydbR$ $\Delta cspC$ ( $\Delta cshA$ $\Delta cspC$ )	JH642	CSP/Helikasen	+

9.	$\Delta ydbR \Delta cspD$ ( $\Delta cshA \Delta cspD$ )	JH642	CSP/Helikasen	+
10.	$\Delta yqfR \Delta cspB$ ( $\Delta cshB \Delta cspB$ )	JH642	CSP/Helikasen	+
11.	$\Delta yqfR \Delta cspC$ ( $\Delta cshB \Delta cspB$ )	JH642	CSP/Helikasen	+
12.	$\Delta yqfR \Delta cspD$ ( $\Delta cshB \Delta cspD$ )	JH642	CSP/Helikasen	+
13.	$\Delta ytrABCDEF$	JH642	ABC-Transporter	-
14.	$\Delta desK$	JH642	Zweikomponentensystem	+ (-Ile)
15. a)	$\Delta sigL$	JH642	Sigmafaktor L	+
b)	$\Delta sigL$	MR168	Sigmafaktor L	+
16. a)	$\Delta bkdR$	JH642	Transkriptionsaktivator	+ (-Ile)
b)	$\Delta bkdR$	MR168	Transkriptionsaktivator	+
17. a)	$\Delta yplP$	JH642	Transkriptionsaktivator	+
b)	$\Delta yplP$	MR168	Transkriptionsaktivator	+
18. a)	$\Delta acoR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta acoR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-
19. a)	$\Delta levR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta levR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-
20. a)	$\Delta rocR$	JH642	Transkriptionsaktivator	-
b)	$\Delta rocR$	MR168	Transkriptionsaktivator	-
21.	$\Delta dltA$	JH642	Dealanisierung der Lipoteichonsäure	-
22.	$\Delta ylaG$	JH642	G-Protein (EF-Tu homolog)	-
23.	$\Delta abh$	JH642	ähnlich zu AbrB	-
24.	$\Delta abrB$	JH642	Transkriptionsregulator	-
25.	$\Delta fabI$	JH642	Enoyl-Acyl Trägerprotein Reduktase	+
26.	$\Delta fabL$	JH642	Enoyl-Acyl Trägerprotein Reduktase	+
27.	$\Delta veg$	JH642	unbekannt	-
28.	$\Delta ybdO$	JH642	unbekannt	-
29.	$\Delta ycnL$	JH642	unbekannt	-
30.	$\Delta ydeB$	JH642	unbekannt	-
31.	$\Delta ydjO$	JH642	unbekannt	-
32.	$\Delta yesX$	JH642	unbekannt	-
33.	$\Delta yflG$	JH642	unbekannt	-
34.	$\Delta yheA$	JH642	unbekannt	-
35.	$\Delta yhfH$	JH642	unbekannt	-
36.	$\Delta yjlC$	JH642	unbekannt	-
37.	$\Delta yoaS$	JH642	unbekannt	-
38.	$\Delta ywqH$	JH642	unbekannt	-
39.	$\Delta ybaE$	JH642	unbekannt	-
40.	$\Delta ydhM$	JH642	unbekannt	-
41.	$\Delta ysbA$	JH642	unbekannt	-
42.	$\Delta yscB$	JH642	unbekannt	-
43.	$\Delta ywaC$	JH642	unbekannt	-

---

44.	$\Delta yonU$	JH642	unbekannt	-
45.	$\Delta yshA$	JH642	unbekannt	-



## 7. Literatur

1. **Aguilar, P. S., J. E. Cronan, Jr. und D. de Mendoza.** 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**:2194-200.
2. **Aguilar, P. S., A. M. Hernandez-Arriaga, L. E. Cybulski, A. C. Erazo und D. de Mendoza.** 2001. Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **20**:1681-91.
3. **Ali, N. O., J. Bignon, G. Rapoport und M. Debarbouille.** 2001. Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:2497-504.
4. **Altabe, S. G., P. Aguilar, G. M. Caballero und D. de Mendoza.** 2003. The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a delta5 desaturase. *J Bacteriol* **185**:3228-31.
5. **Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman.** 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**:403-10.
6. **Anagnostopoulos, C. und J. Spizizen.** 1961. Requirements for Transformation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **81**:741-6.
7. **Arnvig, K., B. Hove-Jensen und R. L. Switzer.** 1990. Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **192**:195-200.
8. **Beckering, C. L.** 2004. Kälteschockadaptation von *Bacillus subtilis*: Identifizierung kälteinduzierter Gene und Proteine und Untersuchung ihrer kältespezifischen Funktion und Regulation. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn.
9. **Beckering, C. L., L. Steil, M. H. Weber, U. Völker und M. A. Marahiel.** 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:6395-402.
10. **Bennett, J. und K. J. Scott.** 1971. Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**:173-82.
11. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.

12. **Bremer, E.** 2002. Adaptation to Changing Osmolarity, p. 385-390. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells. ASM Press, Washington, D.C.
13. **Broeze, R. J., C. J. Solomon und D. H. Pope.** 1978. Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **134**:861-74.
14. **Buck, M., M. T. Gallegos, D. J. Studholme, Y. Guo und J. D. Gralla.** 2000. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. *J Bacteriol* **182**:4129-36.
15. **Calogero, S., R. Gardan, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport und M. Debarbouille.** 1994. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J Bacteriol* **176**:1234-41.
16. **Cloutier, J., D. Prevost, P. Nadeau und H. Antoun.** 1992. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of *rhizobia*. *Appl Environ Microbiol* **58**:2846-53.
17. **Cutting, S. M. und P. B. Van der Horn.** 1990. Genetic Analysis-Chapter 2. John Wiley & sons, U.K.
18. **Dagert, M. und S. D. Ehrlich.** 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**:23-8.
19. **Dammel, C. S. und H. F. Noller.** 1995. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* **9**:626-37.
20. **Debarbouille, M., R. Gardan, M. Arnaud und G. Rapoport.** 1999. Role of *bkdR*, a transcriptional activator of the *sigL*-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**:2059-66.
21. **Debarbouille, M., I. Martin-Verstraete, A. Klier und G. Rapoport.** 1991. The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:2212-6.
22. **Debarbouille, M., I. Martin-Verstraete, F. Kunst und G. Rapoport.** 1991. The *Bacillus subtilis sigL* gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:9092-6.

23. **Dubnau, D.** 1991. The competence regulon of *Bacillus subtilis*, p. 147-166, Regulation of procaryotic development. *American Society for Microbiology*, Washington D.C.
24. **Frang, H., V. M. Mikkala, R. Syysto, P. Ollikka, P. Hurskainen, M. Scheinin und I. Hemmila.** 2003. Nonradioactive GTP binding assay to monitor activation of G protein-coupled receptors. *Assay Drug Dev Technol* **1**:275-80.
25. **Grau, R. und D. de Mendoza.** 1993. Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**:535-42.
26. **Graumann, P. und M. A. Marahiel.** 1996. A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* **18**:309-15.
27. **Graumann, P. und M. A. Marahiel.** 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol* **166**:293-300.
28. **Graumann, P., K. Schröder, R. Schmid und M. A. Marahiel.** 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:4611-9.
29. **Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schroder und M. A. Marahiel.** 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol* **25**:741-56.
30. **Graumann, P. L. und M. A. Marahiel.** 1999. Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**:203-9.
31. **Grundy, F. J., D. A. Waters, T. Y. Takova und T. M. Henkin.** 1993. Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **10**:259-71.
32. **Guerout-Fleury, A. M., K. Shazand, N. Frandsen und P. Stragier.** 1995. Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**:335-6.
33. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson und J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* **177**:4121-30.
34. **Hall, M. N., J. Gabay, M. Debarbouille und M. Schwarz.** 1982. A role for messenger-RNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* **295**:616-618.
35. **Helmann, J. D. und C. P. Moran, Jr.** 2002. RNA Polymerase and Sigma Factors, p. 289-312. In A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells. ASM Press, Washington, D.C.

36. **Hoch, J. A. und J. Mathews.** 1973. Chromosomal location of pleiotropic sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **73**:215-228.
37. **Holtzclaw, W. D. und L. F. Chapman.** 1975. Degradative acetolactate synthase of *Bacillus subtilis*: purification and properties. *J Bacteriol* **121**:917-22.
38. **Huang, M., F. B. Oppermann-Sanio und A. Steinbuchel.** 1999. Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J Bacteriol* **181**:3837-41.
39. **Huang, Y. und Z. Liu.** 2002. The ATPase, RNA Unwinding, and RNA Binding Activities of Recombinant p68 RNA Helicase. *J Biol Chem* **277**:12810-12815.
40. **Hunger, K.** 2006. Kälteschockantwort von *Bacillus subtilis*: *Supercoil*-regulierte Kälteschockproteine und die kälteinduzierte DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn.
41. **Hunger, K.** 2002. Rolle des Zweikomponentensystems DesK/DesR und des ABC-Transporters YtrABCDEF bei der Kälteanpassung von *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn.
42. **Hunger, K., C. L. Beckering und M. A. Marahiel.** 2004. Genetic evidence for temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol Lett* **230**:41-46.
43. **Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegshoff, P. L. Graumann und M. A. Marahiel.** 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:240-8.
44. **Jiang, W., Y. Hou und M. Inouye.** 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**:196-202.
45. **Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. Jiang und M. Inouye.** 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:76-80.
46. **Jones, P. G., R. A. VanBogelen und F. C. Neidhardt.** 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:2092-5.
47. **Kaan, T., G. Homuth, U. Mader, J. Bandow und T. Schweder.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* **148**:3441-55.
48. **Kaiser, D. und R. Losick.** 1993. How and why bacteria talk to each other. *Cell* **73**:873-85.

49. **Kaneda, T.** 1977. Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol Rev* **41**:391-418.
50. **Kaneda, T.** 1991. Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**:288-302.
51. **Kim, L., A. Mogk und W. Schumann.** 1996. A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**:71-6.
52. **Klein, C., C. Kaletta, N. Schnell und K. D. Entian.** 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl Environ Microbiol* **58**:132-42.
53. **Klein, W., M. H. Weber und M. A. Marahiel.** 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* **181**:5341-9.
54. **Kossen, K. und O. C. Uhlenbeck.** 1999. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Res* **27**:3811-3820.
55. **Krispin, O. und R. Allmansberger.** 1995. Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**:129-35.
56. **Kruger, E. und M. Hecker.** 1998. The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J Bacteriol* **180**:6681-8.
57. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin und et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-56.
58. **Kuwayama, H., S. Obara, T. Morio, M. Katoh, H. Urushihara und Y. Tanaka.** 2002. PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **30**:E2-2.
59. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
60. **Lee, C., A. Levin und D. Branton.** 1987. Copper staining: a five-minute protein stain for sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **166**:308-12.

61. **Losick, R., P. Youngman und P. J. Piggot.** 1986. Genetics of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* **20**:625-69.
62. **Lottering, E. A. und U. N. Streips.** 1995. Induction of cold shock proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **30**:193-9.
63. **Majumdar, D., Y. J. Avissar und J. H. Wyche.** 1991. Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA. *Biotechniques* **11**:94-101.
64. **Marahiel, M. A. und P. Zuber.** 1999. Sporulation and Cell Differentiation, Biology of the Prokaryotes (J. W. Lengler, Drews, G., and Schlegel, H. G., Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S. 586-601.
65. **Martin-Verstraete, I., M. Debarbouille, A. Klier und G. Rapoport.** 1994. Interactions of wild-type and truncated LevR of *Bacillus subtilis* with the upstream activating sequence of the levanase operon. *J Mol Biol* **241**:178-92.
66. **Mogk, A., G. Homuth, C. Scholz, L. Kim, F. X. Schmid und W. Schumann.** 1997. The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* **16**:4579-90.
67. **Mullis, K. B. und F. A. Faloona.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-50.
68. **Neuhaus, K., S. Rapposch, K. P. Francis und S. Scherer.** 2000. Restart of exponential growth of cold-shocked *Yersinia enterocolitica* occurs after down-regulation of cspA1/A2 mRNA. *J Bacteriol* **182**:3285-8.
69. **O'Farrell, P. H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**:4007-21.
70. **Phadtare, S. und M. Inouye.** 2004. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**:7007-14.
71. **Phan-Thanh, L. und T. Gormon.** 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **16**:444-50.
72. **Porath, J., J. Carlsson, I. Olsson und G. Belfrage.** 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**:598-9.
73. **Rabilloud, T.** 1990. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**:785-94.

74. **Rogers, G. W., N. J. Richter und W. C. Merrick.** 1999. Biochemical and Kinetik Charakterization of the RNA Helikase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A. *J Biol Chem* **18**:12236-12244.
75. **Schaeffer, P., J. Millet und J. P. Aubert.** 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**:704-11.
76. **Schindelin, H., M. A. Marahiel und U. Heinemann.** 1993. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**:164-8.
77. **Serrano, M., S. Hovel, C. P. Moran, Jr., A. O. Henriques und U. Volker.** 2001. Forespore-specific transcription of the *lonB* gene during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:2995-3003.
78. **Shingler, V.** 1996. Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* **19**:409-16.
79. **Short, J. M., J. M. Fernandez, J. A. Sorge und W. D. Huse.** 1988. Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**:7583-600.
80. **Southern, J. A., D. F. Young, F. Heaney, W. K. Baumgartner und R. E. Randall.** 1991. Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol* **72 ( Pt 7)**:1551-7.
81. **Sutcliffe, J. G.** 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43 Pt 1**:77-90.
82. **Tsu, C. A., K. Kossen und O. C. Uhlenbeck.** 2001. The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* **7**:702-709.
83. **Tsu, C. A. und O. C. Uhlenbeck.** 1998. Kinetik Analysis of the RNA-Dependent Adenosinetriphosphatase Activity of DbpA, and *Escherichia coli* DEAD Protein Specific for 23S Ribosomal RNA. *Biochemistry* **37**:16989-16996.
84. **Weber, M. H., W. Klein, L. Muller, U. M. Niess und M. A. Marahiel.** 2001. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* **39**:1321-9.
85. **Weber, M. H. und M. A. Marahiel.** 2003. Bacterial cold shock responses. *Sci Prog* **86**:9-75.

86. **Wiegeshoff, F.** 2003. Herstellung von *Bacillus subtilis* - Deletionsmutanten und Charakterisierung mittels 2D - Gelelektrophorese. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn.
87. **Wiesner, J.** 2006. Untersuchungen zu Umstrukturierung des Ribosoms durch das PY-Homologe YvyD und zum Zusammenspiel der DEAD-Box RNA-Helikasen CshA und CshB mit den CSPs durch Deletionsstudien in *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit. Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn.
88. **Wu, L. und N. E. Welker.** 1991. Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J Bacteriol* **173**:4889-92.
89. **Wulff, D. L., M. Mahoney, A. Shatzman und M. Rosenberg.** 1984. Mutational analysis of a regulatory region in bacteriophage lambda that has overlapping signals for the initiation of transcription and translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:555-559.
90. **Yoshida, K. I., Y. Fujita und S. D. Ehrlich.** 2000. An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**:5454-61.
91. **Yu, E. und G. W. Owtrim.** 2000. Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein ChrC as an RNA helicase. *Nucleic Acids Res* **28**:3926-3934.
92. **Zuber, P., M. M. Nakano und M. A. Marahiel.** 1993. Peptide antibiotics. In: *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria (A. L. Sonenshein, Hoch, J.A., und Losick, R., Hrsg.), *Am Soc Microbiol*, Washington, D.C., S. 897-916.



## **Danksagung**

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel, der mit viel Energie und seiner steten Diskussionsbereitschaft meine Arbeit förderte. Durch ihn wurde die fruchtbare Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Uwe Völker und Prof. Dr. Erhard Bremer initiiert, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Lars-Oliver Essen danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Uwe Völker von der Universität Greifswald, seiner gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Dr. Leif Steil und Dr. Ulrike Mäder danke ich für die engagierte Zusammenarbeit, angeregte Diskussionen und ihre herzliche Gastfreundschaft.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Marahiel möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima danken, das weit über das Labor hinausging. Die abendlichen Aktivitäten in sportlicher und unsportlicher Hinsicht mit Carsten Beckering, Claudia Chiocchini, Ina Hoyer, Karen Hunger, Thomas Kurpiers, Daniel Stein, Björn Wagner, Julia Wiesner und Melanie Wittmann hatten am guten Gelingen dieser Arbeit maßgeblichen Anteil.

Besonders möchte ich an dieser Stelle meinen Kollegen und Kolleginnen aus dem Bereich Kälteschock Dr. Carsten Beckering, Karen Hunger und Julia Wiesner für die „coole“ Forschung und Zusammenarbeit danken. Für die Unterstützung bei allen massenspektrometrischen Messungen und seiner Hilfe bei der Bewältigung des Computeradministratorjobs möchte ich Dr. Uwe Linne danken.

Für das schnelle Korrekturlesen des Manuskripts und die zahlreichen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Carsten Beckering und Karen Hunger.

Meinen Dank möchte ich auch dem fleißigen und immer hilfsbereiten schon als zu sehr selbstverständlich hingenommenen Personal Antje Schäfer, Gabi Schimpff-Weiland, Steffi Weimer, Rosi Roller-Müller, Horst Aldag, der Elektronikwerkstatt, dem Glas- und Chemikalienlager der Universität Marburg und Stefanie Leja von der Universität Greifswald aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Andi, die durch ihre liebevolle Unterstützung nicht zuletzt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.